



HAL
open science

Interactions entre rythmes rapides et rythmes lents dans la représentation de l'information olfactive dans le réseau bulbaire

Tristan Cenier

► To cite this version:

Tristan Cenier. Interactions entre rythmes rapides et rythmes lents dans la représentation de l'information olfactive dans le réseau bulbaire. Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10093 . tel-00543909

HAL Id: tel-00543909

<https://theses.hal.science/tel-00543909v1>

Submitted on 6 Dec 2010

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.

N° d'ordre : 093 - 2009

Année 2009

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON I

École Doctorale Neurosciences et Cognition

DIPLÔME DE DOCTORAT EN NEUROSCIENCES

(arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 3 juillet 2009 par

Tristan CENIER

**INTERACTIONS ENTRE RYTHMES RAPIDES ET
RYTHMES LENTS DANS LA REPRÉSENTATION
DE L'INFORMATION OLFACTIVE DANS LE
RÉSEAU BULBAIRE**

Directeur de thèse :
Dr. Nathalie BUONVISO

JURY : Pr. Rémi GERVAIS (Président)
Dr. Nathalie BUONVISO (Directeur)
Dr. Catherine TALLON-BAUDRY (Rapporteur)
Dr. Hirc GURDEN (Rapporteur)
Dr. Dominique MARTINEZ (Examineur)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD LYON I

Président de l'Université

Vice-président du Conseil Scientifique
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire
Secrétaire Général

M. le Professeur L. Collet

M. le Professeur J.F. Mornex
M. le Professeur G. Annat
M. le Professeur D. Simon
M. G. Gay

UFR SANTÉ

Composantes

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec
UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche
UFR de Médecine Lyon-Nord
UFR de Médecine Lyon-Sud
UFR d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut Techniques de Réadaptation
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Cochat
Directeur : M. le Professeur X. Martin
Directeur : M. le Professeur J. Etienne
Directeur : M. le Professeur F.N. Gilly
Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois
Directeur : M. le Professeur F. Locher
Directeur : M. le Professeur Y. Matillon
Directeur : M. le Professeur P. Farge

UFR SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Composantes

UFR de Physique
UFR de Biologie
UFR de Mécanique
UFR de Génie Electrique et des Procédés
UFR Sciences de la Terre
UFR de Mathématiques
UFR d'Informatique
UFR de Chimie Biochimie
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives
Observatoire de Lyon
Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon
Institut Universitaire de Technologie A
Institut Universitaire de Technologie B
Institut de Science Financière et d'Assurance

Directeur : Mme. la Professeure S. Fleck
Directeur : M. le Professeur H. Pinon
Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid
Directeur : M. le Professeur G. Clerc
Directeur : M. le Professeur P. Hantzpergue
Directeur : M. le Professeur A. Goldman
Directeur : M. le Professeur S. Akkouche
Directeur : Mme. la Professeure H. Parrot
Directeur : M. C. Collignon
Directeur : M. le Professeur R. Bacon
Directeur : M. le Professeur J. Lieto
Directeur : M. le Professeur M. C. Coulet
Directeur : M. le Professeur R. Lamartine
Directeur : M. le Professeur J.C. Augros

INTERACTIONS ENTRE RYTHMES RAPIDES ET RYTHMES LENTS DANS LA REPRÉSENTATION DE L'INFORMATION OLFACTIVE DANS LE RÉSEAU BULBAIRE.

Laboratoire de Neurosciences Sensorielles, Comportement et Cognition.
UMR5020, CNRS, UCBL
50 av. Tony Garnier, 69366 Lyon.

Une particularité de la modalité sensorielle olfactive est la nature complexe du stimulus chimique à représenter. Les cellules sensorielles de la cavité nasale sont sensibles aux traits physico-chimiques des molécules et transmettent cette information vers le bulbe olfactif, premier relais central de cette modalité. L'organisation des voies de projection vers le bulbe entraîne une spatialisation de l'activité dans cette structure, ce qui constitue un mode de représentation de l'information mais qui n'est pas suffisant à lui seul. Le bulbe olfactif est également marqué par des phénomènes dynamiques prépondérants. Tout d'abord le rythme respiratoire, qui organise temporellement le niveau d'activation de l'appareil sensoriel, ensuite les oscillations des potentiels de champs locaux, et enfin les oscillations sous-liminales des potentiels de membrane des cellules. Ces éléments dynamiques pourraient être le support de la formation d'assemblées de neurones, sous-populations de cellules synchronisées transitoirement et permettant la représentation de l'information suivant un principe spatio-temporel. Les travaux présentés dans cette thèse sont basés sur l'enregistrement conjoint des activités unitaires des cellules du bulbe, des oscillations des potentiels de champs locaux et de la respiration en réponse à des stimulations olfactives. Nous montrons les relations existant entre les différents phénomènes dynamiques et comment ils permettent d'organiser l'activité des cellules pour aboutir à la formation d'assemblées de neurones fonctionnelles. Nous mettons particulièrement en évidence le rôle central de la respiration dans le fonctionnement intégré du bulbe olfactif.

Mots-clefs :

bulbe olfactif, oscillations, représentation spatio-temporelle, potentiels de champs locaux, activités unitaires, respiration.

FAST AND SLOW RHYTHMS INTERACTIONS IN OLFACTORY INFORMATION REPRESENTATION IN BULBAR NETWORK.

Laboratory of Sensory Neuroscience, Behavior and Cognition.
UMR5020, CNRS, UCBL
50 av. Tony Garnier, 69366 Lyon, France.

A striking feature of the olfactory sensory system is its ability to deal with a complex multi-dimensional chemical stimuli. Receptor cells in the nasal cavity are sensitive to specific features of molecules and transmit this information to the olfactory bulb, first relay for olfaction in the central nervous system. Due to the organization of projection pathways to the bulb, afferent information activates the structure in a topographical fashion; although this may constitute a coding strategy for olfactory information it has proven insufficient, and other strategies must be investigated. Dynamic phenomena are a preponderant feature of the olfactory bulb. The respiratory rhythm imposes a sinusoidal level of activation to the system, oscillations in local field potentials and subthreshold oscillations in neurons membrane potentials may interact and lead to the transient synchronization of sub-populations of neurons. This particular mechanism, designated as neural assemblies, is in theory a good candidate for the representation of olfactory information. The work presented here is based on conjoint recordings, in anesthetized animals, of unitary activities, oscillations in the LFP and respiration, in response to olfactory stimulation. We show the relationships existing between the various dynamic phenomena, and hypothesize on their functional roles. We propose that a same mechanism may form different neural assemblies each assuming a specific functional role. The respiratory rhythm acts as a gating system, organizing the formation of successive yet different neural assemblies.

Keywords :

olfactory bulb, oscillations, spatio-temporal representations, local field potentials, unitary activities, respiration.

REMERCIEMENTS

AU MOMENT OÙ J'ÉCRIS CES LIGNES, la soutenance de cette thèse est déjà un souvenir. Un souvenir intense, plutôt plaisant et accompagné d'un fort sentiment de devoir accompli. Dix ans plus tôt je m'étais promis d'arriver au grade de docteur et si cette promesse est aujourd'hui réalisée, c'est aussi grâce à de nombreuses personnes à qui je tiens à exprimer une gratitude chaleureuse et sincère.

Tout d'abord bien sûr il me faut remercier les membres de mon jury qui ont accepté de juger mon travail et d'assister à ma soutenance. Merci à Rémi GERVAIS, président du jury ; après avoir tant aimé vous avoir comme professeur, cela me touche particulièrement que vous soyez le témoin de ce point final. Merci à Catherine TALLON-BAUDRY, j'espère pouvoir un jour continuer à discuter avec vous du rôle de la respiration et y apporter de véritables éléments de réponses. Merci à Hirc GURDEN pour un échange très instructif. Que l'esprit d'Adrian Adrian soit toujours avec vous. Merci à Dominique MARTINEZ, j'attends avec impatience le jour où nous pourrions ensemble percer le secret du rythme gamma.

Je ne saurai jamais assez remercier Nathalie BUONVISO. Sous ta houlette, j'ai appris qu'un chercheur doit rêver ses résultats avant de pouvoir les obtenir : les réponses sont là quelque part mais elles ne se livreront qu'à celui qui a suffisamment de souplesse et d'imagination pour aller les chercher. Tu m'as appris bien plus que tu ne le penses, tant scientifiquement qu'humainement et tu as maintes fois su me redonner la confiance en moi nécessaire pour poursuivre. Je suis assez triste de partir sans t'avoir définitivement convertie à \LaTeX , mais je garde espoir.

Enfin, si je suis aujourd'hui docteur en neurosciences plutôt que projectionniste, médecin légiste, pilote de ligne ou maçon, je le dois à un nombre de personnes marquantes, chacune ayant influencé mon parcours d'une façon ou d'une autre. Je désire donc maintenant les remercier de m'avoir conduit ici : M. Buteau, en CM2 m'a donné le goût pour la science. MM. Chalard et Leyendecker, en collègue et lycée, m'ont fait aimer la biologie. C'est pendant un cours de M. Noss, en terminale, que j'ai décidé que si je faisais de la recherche un jour, ce serait sur les neurones et le cerveau. Brigitte Paulignan m'a poussé un cran plus loin en me faisant découvrir l'électrophysiologie. Karyn Julliard m'a fait connaître Nathalie Buonviso et la suite est connue.

Mais pour avancer sur ce parcours, tout jalonné qu'il soit, j'ai pu compter sur bien d'autres personnes, à commencer bien sûr par ma famille. Merci de tout cœur à ma grand-mère Yvette, ma cousine Florence, mes nombreux oncles et surtout Jean et Jean-Pierre, qui ne sont toujours pas descendus de leurs piédestals, mes non moins nombreuses tantes, principalement Geneviève, sans qui je ne serais certainement pas là où j'en suis aujourd'hui.

d'hui : les longues soirées à faire des exercices viennent de porter un beau fruit. Merci du fond du cœur à tout ceux qui, s'ils n'étaient pas de la famille, seraient de merveilleux amis : mon frère-cousin Frédéric, ma sœur Anne, mes frères Ludovic et Richard, mon cousin Antoine, ma filleule préférée Hélène, mon cousin chéri Jean-Baptiste, mon inénarrable cousin Blaise, mon cousin adoré Samuel, ma cousine tant aimée Anna, ma si belle cousine Albertine et bien sûr tous leurs petits pioupiou, qui méritent tant d'éloges que je n'aurai jamais ici la place pour leur rendre justice. Merci à toute ma belle famille, Alain qui m'a toujours encouragé dans la voie des études et Emmanuelle, Simone qui nous a si souvent rendu la vie plus facile et Gérard, Brigitte et Jean-Pierre pour tant de choses, y compris des moments de détente bienvenus, Antoine qui sait tout le bien que je pense de lui.

Il y a ceux qui sont de si bons amis qu'on aurait envie qu'ils soient de la famille : Olivier, Vivien, Guillaume, Julien et Julien, Yannick, Amandine, Nicolas, ma frangine Rawan, Martial, Jean-Philippe, mais aussi ce gronaz de Yannick (tu n'oublies pas que ton fils est promis à ma fille hein ?), Flavie, Jane, Jean-Pierre, Jean-Philippe, Virginie, Mounir, Yazid, Gwladys, Johan, mais aussi Corine, Philippe, Nicolas, Nadine, Anne-Marie, François, Marc, Belkacem, Vincent, Stéphane... avec une mention spéciale pour Agnès, puisque notre amitié remonte maintenant à bien longtemps, Samuel dont l'excellence ne le dispute qu'à son formidable goût en matière d'automobile, Germain, mon compagnon de douleur, que ce soit pour la rédaction, la préparation de soutenance ou la paperasserie pour les visas, Virginie qui est trop forte en informatique, Emmanuelle qui va devoir se battre avec mes hiéroglyphes et mes scripts pythons et bien sûr, une orchidée délicate, la toujours charmante Pascaline.

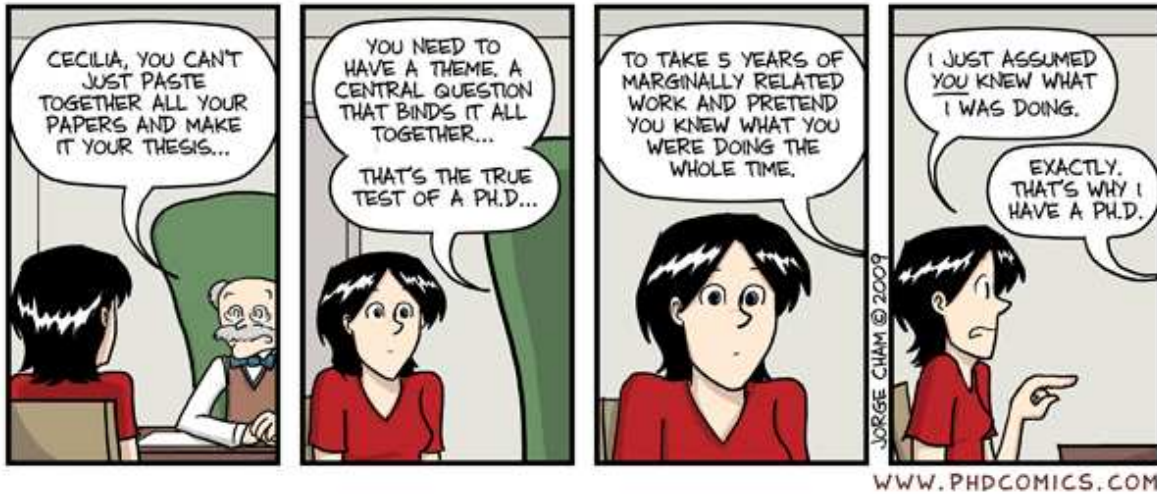
Enfin, les mots seuls sont insuffisants pour exprimer mes sentiments pour Gaëtan, mon ami, mon frère, mon modèle. Si je suis triste de quitter pour un temps tous les gens mentionnés ici, je suis heureux de te retrouver de l'autre côté de l'océan.

Emmanuelle, tu es celle que j'aime, c'est aussi au nom de nous deux que j'ai effectué tout ce travail. Depuis que tu es avec moi chaque jour est un nouveau pas en avant. Ma Charlotte, retrouver tes rires et tes gazouillis le soir m'a souvent permis de traverser de longues journées éprouvantes. Pour vous deux je soulèverai autant de montagnes qu'il le faudra.

À mon oncle, à ma tante, mes parents.

IMAGINE-TOI : tout ça, là, dans les nerfs, dans
« la tête, c'est à dire là-dedans, dans le cerveau, ces
nerfs, ils ont des petites queues, comme ça, les nerfs, des
petites queues, bon, et, alors, dès qu'ils se mettent, je
ne sais pas, à trembler... c'est à dire, tu vois, je regarde
quelque chose avec mes yeux, comme ça, et, elles, elles se
mettent à trembler, les petites queues... et quand elles
tremblent, c'est là que l'image apparaît ... »

Fédor Dostoïevski, *Les frères Karamazov*, 1880.
ed. BABEL, tome II, p. 463.



"Piled Higher and Deeper" by Jorge Cham
www.phdcomics.com

Tableaux des abbréviations	1
1 INTRODUCTION	3
2 RÉSULTATS	78
3 DISCUSSION	105
Annexes	125
Table des figures	201
Bibliographie	203

Tableaux des abbréviations	1
1 INTRODUCTION	3
1.1 Préambule	4
1.2 La représentation de l'information.	6
1.2.1 Quelques exemples	7
1.2.1.1 Le système visuel.	7
1.2.1.2 Le système auditif.	8
1.2.1.3 Les sens chimiques	9
1.3 Anatomie du bulbe olfactif.	12
1.3.1 Organisation du bulbe.	12
1.3.2 Synaptologie du bulbe olfactif.	17
1.3.3 Projections centripètes.	19
1.3.4 Projections centrifuges.	20
1.3.5 Le système olfactif de l'insecte.	21
1.4 Le codage spatial.	23
1.4.1 Le répertoire des récepteurs olfactifs et les connexions au bulbe.	23
1.4.1.1 Le domaine de spécificité des récepteurs olfactifs.	26
1.4.1.2 L'expression des récepteurs olfactifs.	27
1.4.1.3 Organisation des projections.	28
1.4.2 La carte glomérulaire	30
1.4.3 Les limitations du codage spatial.	35
1.5 Le codage temporel	40
1.5.1 Caractéristiques des rythmes dans le bulbe olfactif.	42
1.5.1.1 Les rythmes lents	43
1.5.1.2 Les rythmes rapides.	50
1.5.2 Mécanismes générateurs des rythmes rapides.	55

1.5.3	Synchronisations, oscillations et assemblées.	60
1.5.4	Des assemblées, oui mais après ?	64
1.5.5	L'évolution de la représentation de l'information dans le temps.	67
1.5.6	Que reste-t-il du codage spatial ?	70
1.6	Problématique	74
1.6.1	L'information olfactive.	74
1.6.2	Rôle putatif des oscillations bulbaires.	75
1.6.3	Questions posées.	75
2	RÉSULTATS	78
2.1	Première étude	79
2.2	Deuxième étude	90
2.3	Développement des méthodes	102
3	DISCUSSION	105
3.1	L'alternance des rythmes bêta et gamma	106
3.2	Hypothèses fonctionnelles	111
3.3	Anesthésié versus vigile	119
3.4	Conclusion générale	121
	Annexes	125
A	Articles de méthode	126
B	Article de modélisation	142
C	Article d'encyclopédie	181
D	Communications affichées	188
D.1	ECRO 2004	189
D.2	ECRO 2006	192
D.3	ECRO 2008	195
D.4	ISOT 2008	198
	Table des figures	201
	Bibliographie	203

Tableaux des abréviations

Les abréviations adoptées dans ce manuscrit correspondent aux termes anglais, dans un souci de cohérence avec la littérature en générale et les articles ci-inclus en particulier. Le tableau suivant présente la liste des abréviations utilisées en indiquant le terme anglais correspondant et sa traduction française.

Abbréviation	Terme correspondant	Terme français
AL	Antennal Lobe	Lobe antennaire
AON	Anterior Olfactory Nucleus	Noyau olfactif antérieur
AP	Action Potentials	Potentiels d'action
CSD	Current Source Density	Densité de source de courant
DN	Deutoneurons	Deutoneurones
EOG	Electro Olfactogram	Electro-olfactogramme
EPL	External Plexiform Layer	Couche plexiforme externe
EPSP	Excitatory Post-Synaptic Current	Courant post-synaptique exciteur
ETC	External Tufted Cells	Cellules à panache externes
GC	Granule Cells	Cellules granulaires
HRP	Horseradish Peroxydase	Péroxydase de raifort
IPSP	Inhibitory Post-Synaptic Current	Courant post-synaptique inhibiteur
KC	Kenyon Cells	Cellules de Kenyon
LFP	Local Field Potentials	Potentiels de champs locaux
LHI	Lateral Horn Interneurons	Interneurones de la corne latérale
LN	Local Neurons	Neurones locaux
LOT	Lateral Olfactory Tract	Tractus olfactif latéral
M/T	Mitral/Tufted (cells)	(cellules) mitrales/à panache
MB	Mushroom Body	Corps pédonculé
MC	Mitral Cells	Cellules mitrales
MRR	Molecular Receptor Range	Champ récepteur moléculaire
OB	Olfactory Bulb	Bulbe olfactif
OR	Olfactory Receptors	Récepteurs olfactifs
ORN	Olfactory Receptor Neurons	Neurorécepteurs olfactifs
OV	Odds Value	Rapport de probabilités
PN	Projection Neurons	Neurones de projection
RM	Respiratory Modulation	Modulation respiratoire
SA	Short Axon cells	Cellules à axone court
TC	Tufted Cells	Cellules à panache
TFR	Time-Frequency Representation	Représentation temps-fréquence

Abbréviation	Terme correspondant
[¹⁴ C]2-DG	2-déoxyglucose, marqué au carbone 14
AMPA	(<i>RS</i>)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolyl)propionique acid
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
DAP-V	D-2-Amino-5-Phosphopentanoic acid
GABA	Gamma Amino-Butyric Acid
NBQX	6-nitro-7-sulfamoylbenzo- <i>f</i> -quinoxaline-2,3-dione
NMDA	<i>N</i> -Méthyl- <i>D</i> -Aspartate
TEA	Tetra-Ethyl-Ammonium
TTX	Tetrodotoxin

PARTIE 1

INTRODUCTION

1.1 Préambule

L'HISTOIRE DES SCIENCES fait traditionnellement remonter les premières études électrophysiologiques sur le système olfactif aux années 40, les attribuant à lord Adrian (cf figure 1.1), biologiste anglais qui s'intéressa le premier à cette modalité sensorielle, largement délaissée en une époque où on lui préférait l'étude des systèmes visuels, auditifs, voire somesthésiques. Si lord Adrian est le pionnier de l'olfaction *in vivo*, enregistrant là où aucun homme avant lui n'avait posé son électrode, il ne faut pas oublier les magnifiques descriptions en textes et dessins du bulbe olfactif, de ses cellules, de ses axones et ses réseaux de dendrites, réalisées par Ramon y Cajal au début du XX^{ème} siècle (voir par exemple Cajal 1911) qui sont encore aujourd'hui une référence. Cependant, si Cajal étudiait des tissus morts, lord Adrian fut frappé par la vie, le mouvement, le rythme, qu'il trouvait dans les structures de l'olfaction (Adrian, 1942, 1950).



FIG. 1.1: Sir Edgard Douglas Adrian, 1889–1977

D'après ce dernier,

« Les messages sensoriels qui guident notre comportement se projettent sur un vaste tissu de cellules nerveuses et de dendrites entrelacées qui se doivent d'être constamment actives pour qu'une réponse appropriée soit obtenue. [Pour étudier ces messages] il nous faut comprendre la nature de cette activité persistante et en quoi elle est modifiée lorsqu'un message arrive. [...] Le bulbe olfactif présente cette activité persistante, et à un degré tel que les récents travaux sur le sens olfactif ont dû étudier le bulbe en détails. Leurs résultats méritent d'être décrits car ils illustrent des réactions caractéristiques des plus hauts niveaux du système nerveux. » (Adrian, 1950).

Toujours selon sa plume, l'activité électrique est de deux natures différentes. Tout d'abord, les potentiels d'action, qu'il enregistre surtout dans les zones contenant beaucoup d'axones : le centre du bulbe ou sa prolongation vers les cortex olfactifs, ou parfois lorsque l'électrode traverse le corps cellulaire d'une cellule mitrale. Ensuite, les ondes du potentiel de champs, qu'il enregistre cette fois dans les zones de substance grise, depuis la surface du bulbe jusqu'à une couche plus profonde contenant les corps cellulaires des neurones relais de la structure. Adrian classe ces ondes en deux catégories, les ondes induites et les ondes intrinsèques. Les ondes induites sont enregistrées lors de la présentation d'une odeur, en réponse à des stimulus considérés comme « forts » (de concentration élevée). Elles apparaissent à chaque inspiration, avec un décours fusiforme augmentant puis diminuant en amplitude, sans changer leur fréquence qui se situe aux alentours des 50 Hz. L'origine de ces ondes est attribuée aux courants synaptiques rythmiques et synchrones apparaissant dans un grand nombre de cellules et liés à la perception de l'odeur. Les ondes intrinsèques sont ainsi nommées car elles ne dépendent pas de la présence de stimulation olfactive pour apparaître, au contraire même, la présentation d'une odeur va abolir ces oscillations. Le mécanisme générateur de ces oscillations n'est pas connu, mais leur origine est probablement différente de celle des ondes induites. Lord Adrian, enfin, rapproche ces oscillations bulbaires de l'activité rythmique enregistrée dans le cervelet et quelques autres structures (cortex visuel, cortex somesthésique...), proposant que ces rythmes ne sont pas confinés au seul système olfactif mais seraient l'expression d'un principe de fonctionnement distribué dans plusieurs structures clés du cerveau.

Le travail effectué pendant mes années de thèse se place dans la continuité de ces travaux pionniers, en ce sens que son ambition n'est pas de trouver la clef de codage de l'information olfactive, mais d'étudier en quoi, et comment, l'activité rythmique d'un réseau de neurones peut servir de support à la représentation d'une information. Cette introduction se veut être une synthèse non-exhaustive des travaux portant sur la représentation de l'information olfactive dans le bulbe olfactif. Nous présenterons tout d'abord la structure du bulbe olfactif ainsi que ses voies d'entrées et de sorties. Nous verrons ensuite que la modalité olfactive se distingue des autres sens par la multi-dimensionalité du signal perçu, et les conséquences que cette particularité impose au système chargé de représenter ce signal. Enfin, et surtout, nous verrons successivement deux principes de représentation de l'information olfactive, le codage spatial et le codage temporel, pour nous rendre compte que ces deux dimensions sont étroitement imbriquées et qu'il faut admettre un principe de codage spatio-temporel, articulé autour de l'organisation anatomique et fonctionnelle du bulbe et des phénomènes dynamiques qui s'y déroulent.

1.2 La représentation de l'information.

SELON UNE GÉNÉRALISATION QUELQUE PEU RÉDUCTRICE, le système nerveux octroie à l'organisme deux fonctions principales : la capacité de connaître son environnement par le biais des systèmes sensoriels et la capacité d'agir sur son environnement par le biais des systèmes moteurs. Dans les deux cas, le système nerveux manipule des représentations d'une information qui peut être le déplacement d'un membre dans l'espace ou la position et la forme d'un objet. Lors de l'exécution des mouvements, l'information motrice est acheminée vers le système musculaire, la question de la représentation de cette information est alors celle de la représentation du schéma corporel, depuis un état de départ vers un état d'arrivée. Dans son versant sensoriel, le système nerveux doit transformer un univers physique et chimique pour le représenter dans un univers composé de cellules connectées entre elles et dotées de la capacité de communication. Dans un tableau célèbre (cf. figure 1.2), René Magritte nous signale que l'on n'est pas mis devant une pipe mais bien devant la représentation d'une pipe. De la même façon le fumeur ne jouit pas de la fumée du tabac mais de la représentation qu'il s'en fait par le biais de ses systèmes sensoriels¹. La conscience de cette discontinuité entre le monde réel et l'idée que l'on s'en fait tourmente l'homme depuis l'antiquité et a inspiré aux philosophes le mythe de la caverne, entre autres, et aux savants, chercheurs et autres curieux l'envie d'aller y voir de plus près.

Au cours de l'évolution, les organes sensoriels se sont spécialisés petit à petit pour

¹Cette observation n'est valable que si l'on s'en tient à l'aspect purement sensoriel de l'acte de fumer : la perception du goût, de l'odeur de la fumée, ses volutes arabesques ; aspect trop souvent négligé face à l'effet froidement pharmacologique de la nicotine.



FIG. 1.2: René Magritte, Trahison des images, 1929

fournir une interface entre l'environnement extérieur et le milieu intérieur. L'environnement extérieur contient des informations, regroupées sous le terme global de sensations, mais dont la nature est variable, allant de l'onde électromagnétique à l'onde de pression, de la température d'un corps et sa texture de surface à sa composition chimique. À chaque type de sensation correspond un appareil sensoriel dédié, capable de convertir la sensation en une perception, créant ainsi une représentation de l'information en provenance de l'environnement extérieur. On peut supposer que la stratégie de représentation de l'information va varier en fonction des caractéristiques de l'information à représenter. Le système visuel a pour tâche de représenter l'organisation dans l'espace de sources ponctuelles de lumières, le système auditif va devoir représenter le contenu fréquentiel de flux sonores, le système olfactif devra représenter la composition chimique d'une fragrance.

1.2.1 Quelques exemples de stratégies de représentation de l'information.

1.2.1.1 Le système visuel.

LE PREMIER ORGANE DU SYSTÈME VISUEL est le globe oculaire. Ses éléments principaux sont la cornée, le cristallin et la rétine. La cornée et le cristallin, semblables à un système de lentille, projettent la lumière pénétrant l'œil pour former sur la rétine une image nette de la scène visuelle. Les photorécepteurs de la rétine vont modifier leur activité en fonction de l'intensité du rayonnement lumineux qui leur parvient. L'information visuelle peut être décomposée en deux dimensions, la première correspondant à la position de la source lumineuse dans la scène visuelle et la deuxième correspondant à l'intensité du rayonnement lumineux émis en ce point. La position de la cellule ganglionnaire sur la surface rétinienne représente alors la première dimension du stimulus, et le niveau d'activation de cette cellule représente sa deuxième dimension. Ainsi, la carte d'activation des cellules ganglionnaires de la rétine correspond à l'agencement réel des zones d'ombres et de lumières de la scène visuelle. Cette information est acheminée au cortex visuel primaire après relais dans le corps genouillé latéral du thalamus. De par sa structure laminaire, le cortex visuel peut être considéré comme un espace en deux dimensions de la même façon que la rétine. On retrouve ainsi au niveau de ce cortex une carte d'activation des cellules pyramidales comparable à la carte d'activation de la rétine. La correspondance spatiale entre le stimulus et sa représentation dans le cortex primaire reçoit le nom de rétinotopie. Cette correspondance spatiale ne s'arrête pas au cortex primaire puisqu'on la retrouve dans de nombreuses aires secondaires du système visuel, ceci

dit la rétinotopie se dilue petit à petit, à mesure que l'on s'intéresse à des aires plus spécialisées dans le traitement de certains aspects spécifiques de l'information visuelle. On a donc avec cette modalité visuelle l'exemple d'une stratégie de représentation de l'information basée sur la correspondance entre la nature de l'information et l'organisation de la structure chargée de sa représentation : l'information visuelle se résume à une collection de points ordonnés dans l'espace et réfléchissant, ou émettant, de la lumière avec une intensité plus ou moins grande ; de la même façon les neurones du cortex visuel primaire ont une position définie dans l'espace et peuvent faire varier l'amplitude, ou intensité, de leur activité. On retrouve le même exemple de représentation pour d'autres modalités, par exemple le système somesthésique où l'information se décompose encore en deux dimensions : position d'origine et intensité du stimulus, et est représentée dans le cortex somesthésique primaire par la position des neurones et leur niveau d'activation.

1.2.1.2 Le système auditif.

LE STIMULUS SONORE, dans sa plus simple expression, est un son caractérisé par une fréquence et une intensité. En situation écologique, les sons perçus sont des sons complexes caractérisés par un spectre sonore, ce dernier pouvant être décomposé en une somme de sons purs possédant chacun une fréquence et une intensité propre. Chez le mammifère, la structure sensorielle associée à la perception auditive est la cochlée, située dans l'oreille interne. L'onde de pression sonore va faire vibrer la membrane basilaire dont les mouvements vont à leur tour stimuler les cellules ciliées interne. La vibration de la membrane basilaire n'est pas uniforme, on peut diviser cette membrane dans sa longueur en zones successives : chacune de ces zones ne vibrera qu'à une fréquence bien précise et par conséquent les cellules ciliées associées à cette zone ne seront actives que si la fréquence en question fait partie du spectre sonore transmis par l'onde de pression (cf. figure 1.3). Ainsi, par sa seule organisation, la cochlée permet la décomposition du spectre sonore : chaque fréquence du spectre est représentée par quelques cellules ciliées, dont le niveau d'activité permettra de représenter l'intensité. Cette représentation est acheminée ensuite au cortex auditif primaire via au moins un relais, par le corps genouillé médian du thalamus. Les cellules ciliées internes codant pour des fréquences proches vont projeter sur des zones proches du cortex auditif primaire (voir figure 1.4) selon un principe proche de l'organisation des systèmes vus précédemment, et portant ici le nom de tonotopie.

Encore une fois ici, l'appareil sensoriel décompose le signal d'entrée en autant de dimensions qui le composent et représente chacune de ces dimensions par une stratégie particulière. La fréquence des composants du spectre sonore est représentée par la position

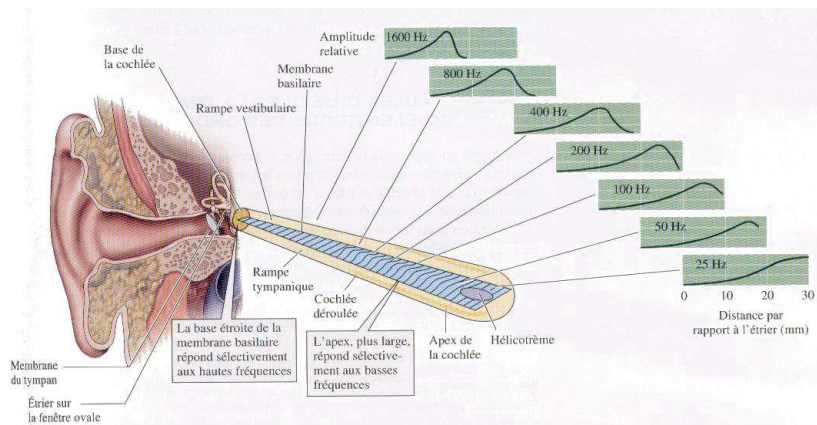


FIG. 1.3: Répartition de la sensibilité fréquentielle sur la membrane basilaire

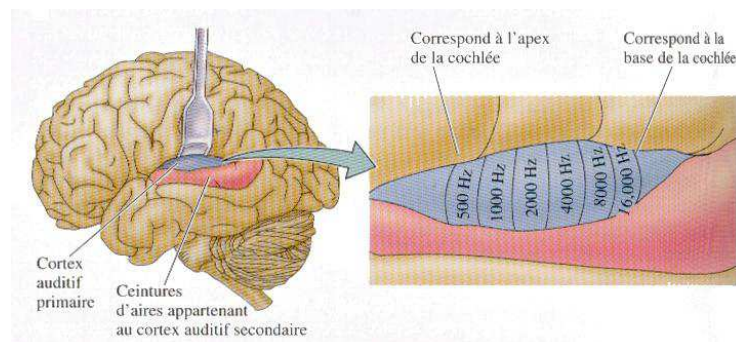


FIG. 1.4: Tonotopie du cortex auditif primaire

des cellules ciliées internes dans la cochlée, l'intensité est représentée par le niveau d'activation de ces cellules. De manière similaire aux systèmes sensoriels vu précédemment, on a un transfert direct de ces représentations entre l'appareil sensoriel et le cortex primaire. En revanche, le système auditif se distingue des systèmes visuel et somesthésique en ce qu'on y trouve l'utilisation d'une dimension spatiale (la position des neurones du cortex primaire) pour représenter une information non-spatiale (la fréquence des composantes du spectre sonore).

1.2.1.3 Les sens chimiques

LA STRATÉGIE UTILISÉE POUR REPRÉSENTER L'INFORMATION au niveau des cortex primaires ne semble donc pas être directement liée à la nature de l'information à re-

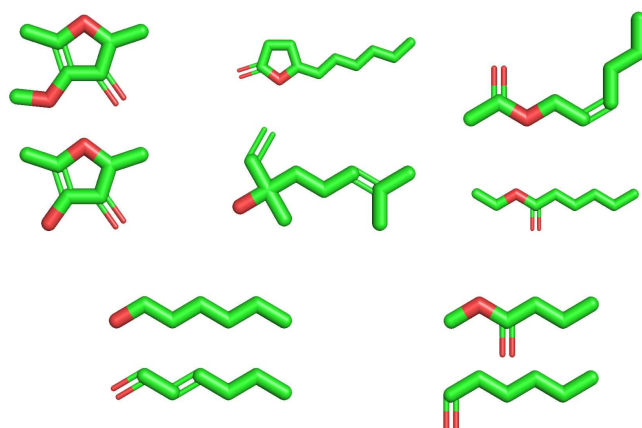


FIG. 1.5: Représentation des 10 principales molécules constituant l'arôme de fraise

présenter, mais plutôt à la manière dont cette information est détectée et transduite en sensation par nos appareils sensoriels. Nous n'avons présenté ici, et brièvement, que des modalités sensorielles associées à des stimulus dits physiques, c'est à dire pouvant être mesurés et quantifiés par des unités physiques : longueur d'onde, fréquence, amplitude, position dans l'espace, etc. Qu'en est-il maintenant des sens dits chimiques, c'est à dire chargés de décrire la composition chimique d'une substance, que celle-ci soit présente dans l'atmosphère (odorat) ou dans notre cavité buccale (goût et odorat) ? Par certains côtés le tableau semble plus simple, tant il est vrai qu'un organisme vivant excelle à produire des molécules réagissant de manières spécifiques avec d'autres molécules bien précises : aussi bien la production d'énergie que la division cellulaire, la locomotion, la photosynthèse, la mise en place des tissus pendant le développement embryonnaire, le fonctionnement du système immunitaire et bien d'autres phénomènes encore, reposent sur l'affinité sélective de molécules pour une enzyme bien précise, pour un récepteur donné, pour un marqueur de surface entre cent, et sur l'issue prévisible de l'interaction qui s'en suivra. Mais cette apparence de simplicité ne doit pas occulter une difficulté majeure, à savoir le nombre de dimensions du stimulus chimique. Si l'information visuelle, somesthésique ou auditive se décomposent en deux dimensions, qu'en est-il de l'information chimique ? La figure 1.5 représente les dix principales molécules parmi les 360 composés volatils constituant l'arôme de la fraise. Si l'on part de l'hypothèse qu'il faut une protéine spécifique pour reconnaître chacune de ces molécules, alors l'arôme de la fraise se décompose en 10 dimensions principales, ce qui dépasse de loin les deux dimensions disponibles a priori pour la représentation de l'information. Cependant, comme il est dit ci-dessus, la stratégie

utilisée pour représenter une information semble être liée non pas à la nature de l'information, mais à la façon dont cette information est recueillie par l'appareil sensoriel. Dans les sections suivantes, nous allons voir en détail la structure du système sensoriel olfactif du mammifère, puis nous examinerons la façon dont ce système traite l'information olfactive et l'utilisation qui est faite de l'espace neuronal pour représenter cette information.

1.3 Anatomie du bulbe olfactif.

L'APPAREIL SENSORIEL OLFACTIF est composé d'une structure réceptrice périphérique, située dans la cavité nasale, et d'un ensemble de structures olfactives du système nerveux central, dédiées à la représentation et à l'analyse de l'information olfactive (cf. figure 1.6). La première de celles-ci, le bulbe olfactif, constitue le sujet de cette étude.

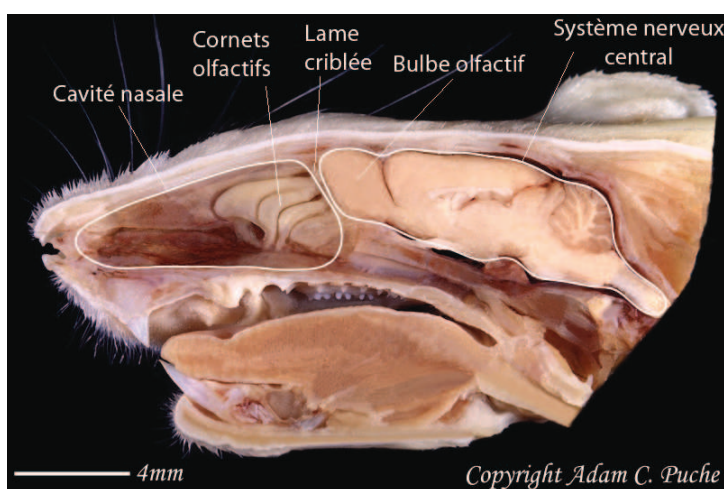


FIG. 1.6: Coupe sagittale d'une tête de rat.

Le système olfactif comprend un système sensoriel périphérique situé dans la cavité nasale, constitué des cornets olfactifs et un système central, séparé de la cavité nasale par la lame criblée de l'éthmoïde et dont le premier élément est le bulbe olfactif.

D'après Adam C. Puche.

1.3.1 Organisation du bulbe.

LE BULBE OLFACTIF est une structure paire, formant l'extrémité la plus rostrale du télencéphale. Il constitue le premier relais olfactif du système nerveux central. Ses afférences proviennent des récepteurs olfactifs de la cavité nasale, ses efférences projettent essentiellement sur le cortex piriforme. Les principaux neurones relais sont les cellules mitrales (MC) et les cellules à panache (TC). Le bulbe olfactif est un paléocortex formé de six couches concentriques enroulées autour d'un canal central, la zone sous-épendymaire, une émanation des ventricules latéraux. Nous décrirons uniquement les constituants neu-

ronaux de ces couches, mais le bulbe olfactif comporte bien sûr une importante part de cellules gliales – astrocytes, oligodendrocytes et microglie. On trouve, de l'extérieur vers l'intérieur (cf. figure 1.7) :

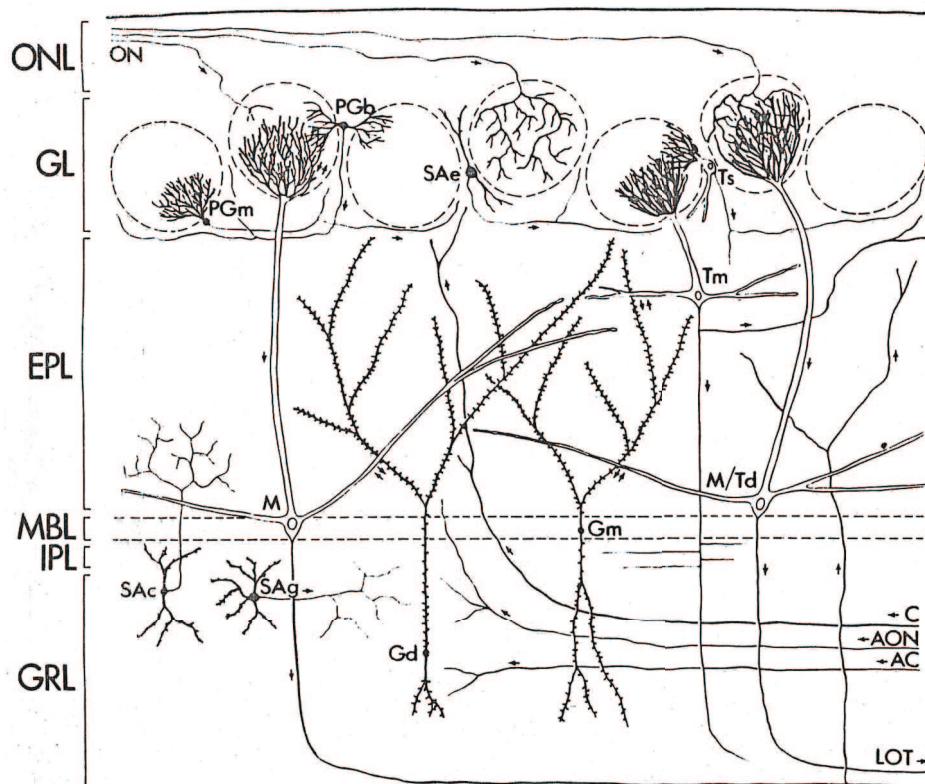


FIG. 1.7: Dessin d'après coloration de Golgi de la structure laminaire du bulbe olfactif, des espèces cellulaires et de leurs dispositions relatives.

Couches : ONL : couche des nerfs ; GL : couche glomérulaire ; EPL : couche plexiforme externe ; MBL : couche des cellules mitrales ; IPL : couche plexiforme interne ; GRL : couche granulaire.

Cellules : PGb : cellule péri-glomérulaire à dendrites biglomérulaires ; PGm : cellule péri-glomérulaire à dendrites monglomérulaires ; SAe : cellule à axone court ; Ts : cellule à panache externe ; Tm : cellule à panache médiane ; Td : cellule à panache interne ; M : cellule mitrale ; Gm : cellule granulaire à soma dans la MBL ; SAc : cellule à axone court de Blanes ; SAg : cellule à axone court de Golgi ; Gd : cellule granulaire à soma dans les couches profondes.

Faisceaux de fibres : ON : nerfs olfactifs ; LOT : tractus olfactif latéral ; C : fibres centrifuges ; AON : fibres en provenance du noyau olfactif antérieur ; AC : fibres en provenance de la commissure antérieure.

Reproduit d'après Shepherd 1972b

1. La couche des nerfs.

Les axones émis par les cellules réceptrices de l'épithélium forment des faisceaux et

convergent vers le bulbe olfactif en traversant la lame criblée, située antérieurement au bulbe olfactif. La couche la plus périphérique du bulbe est donc constituée par ces faisceaux de fibres.

2. La couche glomérulaire.

La couche glomérulaire représente le point d'entrée dans le bulbe olfactif. C'est un ensemble dense de contacts synaptiques entre les axones des ORN et les cellules relais du bulbe olfactif (cellules mitrales et cellules à panache), ainsi qu'entre ces cellules et plusieurs types d'interneurons, ou cellules juxta-glomérulaires : les cellules péri-glomérulaires (PG), les cellules à axones courts (SA) et les cellules à panache externes (ETC) (pour une revue, voir Ennis et al. 2007). Les synapses sont enchâssées entre les corps cellulaires des interneurons et des cellules gliales, formant les glomérules, des neuropils individualisés et sphériques d'environ 100 μm de diamètre (Royet et al., 1988). Le nombre de glomérules est variable selon les espèces et il est estimé que le bulbe olfactif du rat contient entre 3000 et 4200 glomérules (Meisami and Safari, 1981; Royet et al., 1998). Un glomérule reçoit les dendrites apicales de 20-25 cellules mitrales et 50-75 cellules à panache (Cajal, 1911; Allison, 1953b; Shipley et al., 1996). La conséquence du regroupement en glomérules est la discrétisation des entrées sensorielles : les nombreux axones en provenance d'un grand nombre de récepteurs olfactifs convergent vers une seule zone restreinte du bulbe. Cette organisation aura un impact fonctionnel qui sera détaillé plus tard.

3. La couche plexiforme externe.

La couche plexiforme externe (EPL) contient les corps cellulaires des cellules à panache et un réseau d'arborisation dendritique extrêmement dense. Les cellules à panache forment deux sous-populations, les TC médianes et internes, selon la position de leur corps cellulaire dans la couche. Le réseau dendritique est constitué pour une part des dendrites apicales reliant les glomérules aux cellules à panache et aux cellules mitrales, des dendrites secondaires de ces mêmes cellules d'autre part et enfin des dendrites des cellules granulaires. Si les dendrites apicales, généralement épaisses et non-ramifiées (en dehors du glomérule) traversent la couche EPL perpendiculairement, les dendrites secondaires forment un réseau étendu, ramifié et situé dans un plan parallèle aux couches du bulbe. Ce réseau forme de nombreux contacts synaptiques avec les arborisations dendritiques très ramifiées issues des cellules granulaires.

4. La couche des cellules mitrales.

Les corps cellulaires des cellules mitrales sont disposés en une seule rangée régulière et constituent une couche très bien individualisée et mince (diamètre moyen :

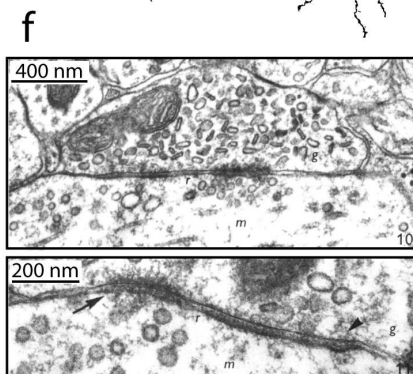
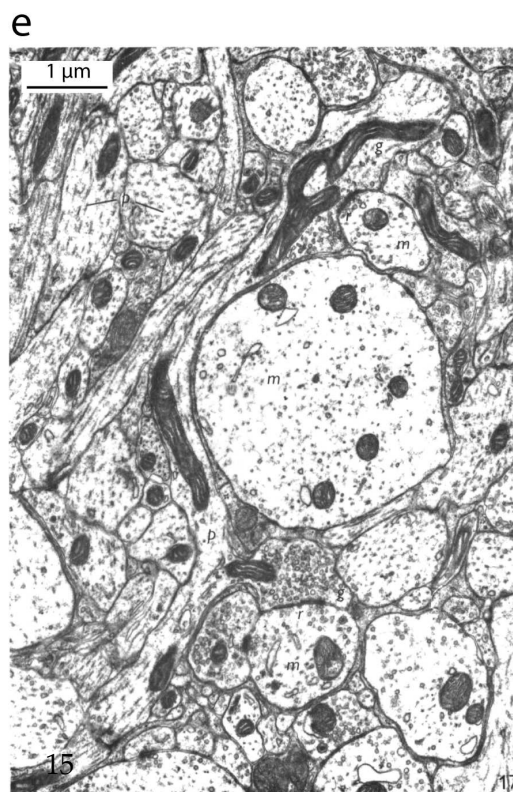
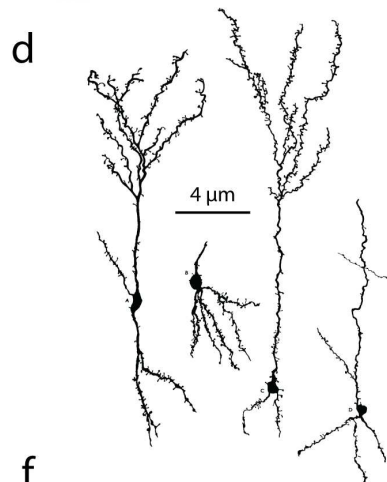
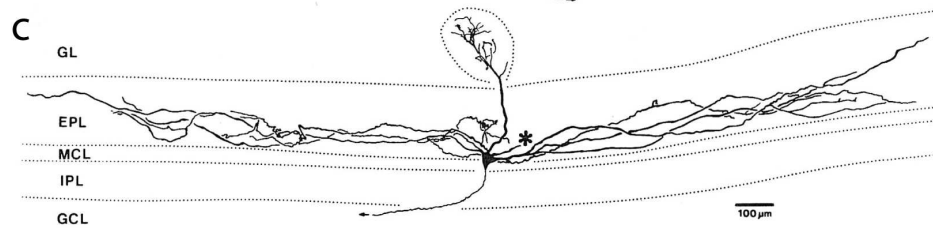
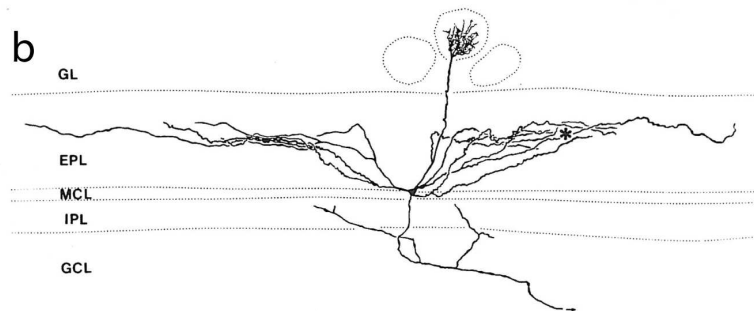
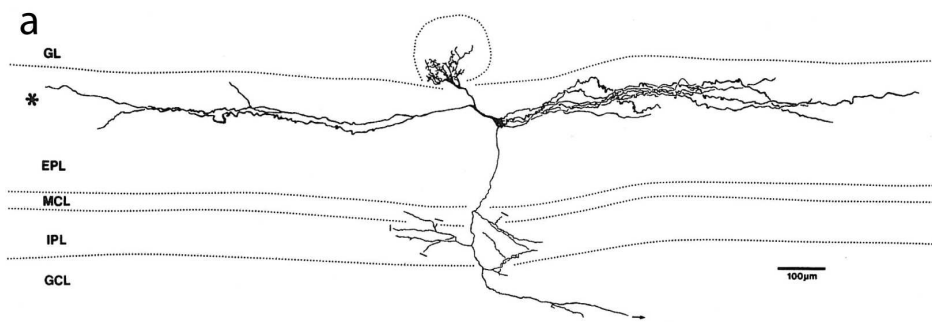


FIG. 1.8: Quelques constituants cellulaires du bulbe olfactif (page 15).

a, b, c : reconstructions d'après observation sur tranche de tissu marqué à la HRP, le site d'injection est indiqué par une astérisque, les traits indiquent le point de disparition d'un axone dans une coupe adjacente. Abréviations : GL : couche glomérulaire ; EPL : couche plexiforme externe ; MCL : couche des cellules mitrales ; IPL : couche plexiforme interne ; GCL : couche granulaire. **a** cellule à panache médiane ; **b, c** : cellules mitrales. On note pour ces deux types de cellules l'étendue le nombre et la différence de profondeur des prolongements dendritiques secondaires. **d** : cellules granulaires, dessins à la chambre claire après coloration de Golgi. On remarque la ramification des arborisations dendritiques superficielles et profondes et les gemmules marquant les zones ramifiées.

e, f : photographies de vues en microscopie électronique situées dans l'EPL ; **p** : processus dendritique superficiel de cellule granulaire ; **m** : processus dendritique secondaire de cellule mitrale ; **g** : gemmule ; **r** : synapse réciproque. **e** : on observe l'émission de deux gemmules par le processus dendritique granulaire ; dans l'une d'entre elle on distingue les deux éléments réciproques de la synapse dendro-dendritique (x 22 000). **f** : haut : synapse dendro-dendritique entre cellule granulaire et cellule mitrale - les vésicules sphéroïdes de la cellule mitrale sont associées à un épaissement asymétrique de la membrane (à droite), et les vésicules aplaties de la gemmule sont associées à un épaissement synaptique symétrique (à gauche) (x 67 000) ; bas : grossissement des épaissements asymétrique (flèche) et symétrique (pointe de flèche) de la membrane dans une synapse réciproque (x 110 000).

Reproduction d'après : **a, b, c** : Orona et al. 1984 ; **d, e** : Price and Powell 1970b ; **f** : Price and Powell 1970c.

30-40 μm chez le rat (Price and Powell, 1970a)). On y compte environ 40 000 cellules mitrales (Meisami, 1989). On trouve également un grand nombre (environ deux fois plus) de corps cellulaire de cellules granulaires dans cette couche (Frazier and Brunjes, 1988).

5. La couche plexiforme interne.

Cette couche, très mince, située immédiatement sous la couche des cellules mitrales, est essentiellement traversée par les axones des MC et des TC, ainsi que par les dendrites des cellules granulaires.

6. La couche granulaire.

La couche la plus profonde du bulbe olfactif contient les corps cellulaires des cellules granulaires (GC). Ces dernières constituent, avec les neurones juxta-glomérulaires, la catégorie des interneurons bulbaire et elles sont, en nombre, la population de cellules la plus importante du bulbe (Shepherd, 1972b), on peut estimer leur nombre aux alentours de $4 \cdot 10^6$. Ces cellules ne possèdent pas d'axone mais émettent deux

arborisations dendritiques, l'une dite superficielle, qui remonte vers la couche EPL, l'autre dite profonde, qui se ramifie dans la couche granulaire. Les dendrites des cellules granulaires sont caractérisées par la formation de nombreuses épines dendritiques, ou gemmules, qui sont le lieu de formation des synapses dendro-dendritiques avec les cellules M/P dans la couche EPL (Price and Powell, 1970b), voir illustration 3. Les dendrites profondes voient la formation de synapses avec les fibres centrifuges en provenance des structures corticales et sous-corticales en amont du bulbe. On distingue trois sous-types de population de GC selon la profondeur de leur soma dans la couche – superficielles, médianes et profondes – les caractéristiques des dendrites variant selon le type de granulaire (Orona et al., 1983). On trouve également dans cette couche, en nombre réduit, des interneurons établissant des connexions restreintes dans les couches profondes du bulbe olfactif : les cellules de Blanes et les cellules de Golgi (Price and Powell, 1970a; Schneider and Macrides, 1978). La couche granulaire est également une zone de passage des axones des cellules relais du bulbe. Ces axones myélinisés se regroupent en faisceaux pour constituer le tractus olfactif latéral (LOT), principale voie de sortie de la structure. Des branches collatérales de ces axones vont former des synapses avec les GC au niveau de leurs dendrites profondes.

1.3.2 Synaptologie du bulbe olfactif.

NOUS PRÉSENTONS ICI, de façon non-exhaustive, la localisation des différents types de récepteurs synaptiques dans le bulbe olfactif. Nous nous concentrons surtout sur les récepteurs de la couche plexiforme externe, la synaptologie complexe des glomérules n'étant pas l'objet de notre travail.

La composante excitatrice dans le bulbe est largement médiée par le glutamate, aussi bien par les fibres en provenance des ORN (Sassoè-Pognetto et al., 1993; Didier et al., 1994) que par les cellules mitrales et à panache (Jacobson et al., 1986; Liu et al., 1989; Trombley and Westbrook, 1990). La transmission excitatrice glutamatergique est médiée par les récepteurs ionotropiques glutamatergiques, regroupant les récepteurs AMPA, présents dans toutes les couches à l'exception de la couche des nerfs (Petralia and Wenthold, 1992; Martin et al., 1993; Molnár et al., 1993), les récepteurs NMDA, présents dans toutes les couches à l'exception de la plexiforme interne, (Watanabe et al., 1993; Monyer et al., 1994; Petralia et al., 1994) et les récepteurs kainate, situées dans l'EPL et la couche des

cellules mitrales (Monaghan and Cotman, 1982; Gall et al., 1990).

Les récepteurs AMPA-kainate et NMDA sont exprimés dans le glomérule par les cellules M/T au niveau de l'arborisation dendritique apicale (Giustetto et al., 1997) et par les cellules périglomérulaires au niveau des synapses dendro-dendritiques qu'elles forment avec les cellules M/T (Giustetto et al., 1997). Dans les couches profondes, on retrouve les récepteurs AMPA-kainate niveau du corps cellulaire et des dendrites des cellules M/T (Giustetto et al., 1997; Montague and Greer, 1999), au niveau des arborisations dendritiques superficielles et profondes des cellules granulaires (Giustetto et al., 1997; Montague and Greer, 1999; Hamilton and Coppola, 2003). Au niveau des synapses dendro-dendritiques mitrales/granules, les récepteurs AMPA-kainate sont exprimés sur l'aspect post-synaptique, conjointement avec les récepteurs NMDA (Sassoè-Pognetto and Ottersen, 2000). On retrouve sur l'aspect pré-synaptique des autorécepteurs glutamatergiques du type NMDA exclusivement (Aroniadou-Anderjaska et al., 1999).

Notons aussi la présence de récepteurs métabotropiques au glutamate, exprimés notamment par les cellules M/T au niveau de leur soma et dendrites apicales et latérales (van den Pol, 1995) ou à leurs extrémités axonales (Kinzie et al., 1995), mais également par les cellules granulaires (Romano et al., 1995), notamment au niveau des synapses dendro-dendritiques avec les cellules M/T. Ces récepteurs métabotropiques sont considérés comme médiateurs de l'excitation glutamatergique en tant qu'autorécepteur et en tant qu'hétérorécepteur selon leur position pré- ou post-synaptique (van den Pol, 1995).

La composante inhibitrice dans le bulbe olfactif repose principalement sur l'acide gamma-amino-butyrique, ou GABA (Nicoll, 1971), mais il faut mentionner aussi l'existence de composantes inhibitrices médiées par la taurine (Didier et al., 1994; Kamisaki et al., 1996) et la glycine (Trombley and Shepherd, 1994), essentiellement au niveau gloméculaire. Les récepteurs ionotropiques GABA_A sont présents dans toutes les couches du bulbe olfactif à l'exception de la plexiforme interne (Palacios et al., 1981; Bowery et al., 1987; Laurie et al., 1992) et sont exprimés par tous les types de neurones, avec quelques variations en nombre et en types de sous-unités (Laurie et al., 1992; Panzanelli et al., 2005). Notons la présence de récepteurs GABA_A sur les cellules granulaires, particulièrement dans la couche granulaire profonde, caractérisés par la sous-unité $\beta 3$ (Laurie et al., 1992), cette sous-unité étant également présente dans certains récepteurs GABA_A des cellules M/T.

Les récepteurs métabotropiques GABA_B sont principalement exprimés dans les glomérules (Bowery et al., 1987; Chu et al., 1990). Au niveau de la synapse dendro-dendritique, les récepteurs GABA_A sont exprimés sur l'aspect post-synaptique (donc par les cellules

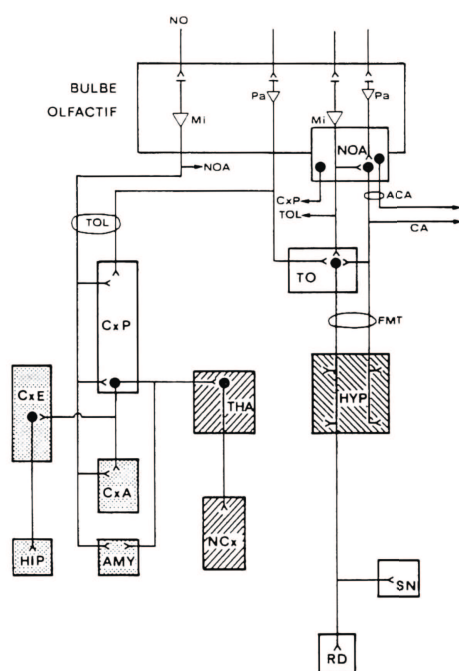


FIG. 1.9: Projections du bulbe sur les centres et les principales voies olfactives centrales d'un seul hémisphère cérébral.

Au niveau du bulbe olfactif : NO : nerf olfactif ; Mi : cellule mitrale ; Pa : cellule à panache ; NOA : noyau olfactif antérieur.

Les faisceaux de fibres : ACA : branche antérieure de la commissure antérieure ; CA ; commissure antérieure ; FMT : faisceau médian du télencéphale ; TOL : tractus olfactif latéral.

Les structures centrales : CxP : cortex piriforme ; RD : raphé dorsalis ; SN : substantia nigra ; TO : tubercule olfactif ; AMY : amygdale corticale ; CxA : cortex péri-amygdalien ; CxE : cortex enthorinal ; HIP : hippocampe ; NCX : néocortex frontal ; THA : thalamus ; HYP : hypothalamus.

En gris : la voie limbique ; en hachures : voies hypothalamique et thalamo-corticale.

Reproduit d'après Gervais 1983, avec l'aimable permission de l'auteur.

M/T) (Giustetto et al., 1998), tandis que l'aspect pré-synaptique présente des autorécepteurs de type $GABA_B$ uniquement (Isaacson and Vitten, 2003).

1.3.3 Projections centripètes.

LES PROJECTIONS ISSUES DU BULBE OLFACTIF sont formées des axones des cellules mitrales et des cellules à panache médiane et internes, regroupés dans le LOT. Le LOT

se projette sur une étendue de structures du télencéphale – cortex piriforme, cortex péri-amygdalien, tubercule olfactif et amygdale en projections directes, et de manière indirecte sur le cortex enthorinal et le thalamus (Gurdjian, 1925; Ban and Zyo, 1962; Heimer, 1968; Price and Powell, 1971; Haberly and Price, 1977; Davis et al., 1978; Haberly and Price, 1978a; Scott et al., 1980; Kevetter and Winans, 1981; Scott, 1981). Une autre voie de sortie est représentée par le noyau olfactif antérieur (AON) et regroupe des collatérales d'axones des MC et TC. L'AON projette directement sur l'hypothalamus (Ferrer, 1969; Barone et al., 1981) et le tubercule olfactif (Newman and Winans, 1980) qui projette à son tour sur l'hypothalamus et les noyaux profonds (raphé, substance noires). Le AON va également contacter le bulbe controlatéral via la commissure antérieure et le AON controlatéral (Haberly and Price, 1978b; Mori et al., 1979). Les projections issues du OB sont excitatrices. L'essentiel des structures contactées par le bulbe olfactif sont donc corticales, ce qui constitue une différence fondamentale de la modalité sensorielle olfactive vis à vis de toutes les autres modalités sensorielles qui font toutes un relais dans le thalamus avant d'atteindre les structures corticales primaires. La figure 1.9 résume les projections du bulbe olfactif.

1.3.4 Projections centrifuges.

AL'EXCEPTION DU TUBERCULE OLFACTIF, toutes les structures recevant des projections directes du bulbe olfactif l'innervent en retour (Ennis et al., 2007). L'ensemble de ces voies en direction de la périphérie sont regroupées sous la dénomination de voies centrifuges. Parmi ces voies centrifuges on peut faire deux grandes distinctions : les projections spécifiques des voies olfactives, et les projections neuromodulatrices. Les projections centrifuges olfactives, majoritairement issues des cellules pyramidales glutamatergiques du cortex piriforme contactent les dendrites profondes des GC (Shepherd, 1972b). L'activité du bulbe olfactif va déclencher en retour une activation des interneurons granulaires inhibiteurs et donc réduire l'activité bulbaire. Cette boucle de rétrocontrôle, dépendante du niveau de l'activité du OB aura des implications fonctionnelles détaillées plus loin. A l'opposé, les projections neuromodulatrices ne seront que lointainement dépendantes de l'activité olfactive. On en distingue trois principales : la voie modulatrice noradrénergique, en provenance du locus coeruleus, projette dans la couche granulaire (Shipley et al., 1985), les voies cholinergiques (Carson, 1984; Shipley and Adamek, 1984) et sérotoninergiques (Araneda et al., 1980), en provenance, respectivement, des noyaux de la bande diagonale et des noyaux du raphé, projettent sur la couche glomérulaire et plus particulièrement

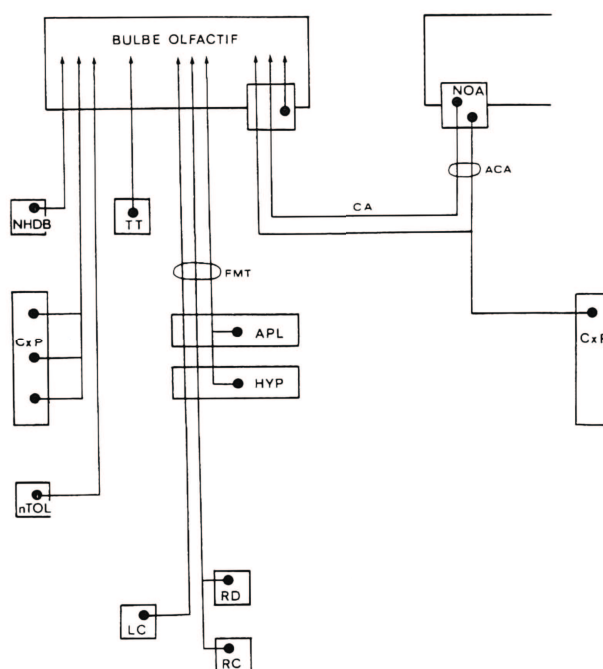


FIG. 1.10: Les afférences au bulbe d'origine centrale.

ACA : branche antérieure de la commissure antérieure ; APL : aire préoptique latérale ; CA : commissure antérieure ; CxP : cortex piriforme ; FMT : faisceau médian du télencéphale ; HYP : hypothalamus ; LC : locus cœruleus ; NHDB : noyau horizontal de la bande diagonale de Broca ; NOA : noyau olfactif antérieur ; nTOL : noyau tractus olfactif latéral ; RC : raphé centralis ; RD : raphé dorsalis ; TT : ténia tecta.

Reproduit d'après Gervais 1983, avec l'aimable permission de l'auteur.

sur les neurones juxta-glomérulaires. Il s'agit ici, d'une modulation de fond, reçue par le bulbe en même temps que par la quasi totalité de l'encéphale, dépendante de l'état général de l'animal, comme son niveau de vigilance ou son métabolisme et corrélée à un état cognitif (attention, motivation) et au maintien homéostatique. L'ensemble des projections vers le bulbe olfactif est résumé dans la figure 1.10.

1.3.5 Le système olfactif de l'insecte.

DANS CET OUVRAGE il sera fréquemment fait référence au système olfactif de l'insecte. Si leur système olfactif est semblable à celui des vertébrés d'un point de vue structurel et fonctionnel, la nomenclature est, elle, différente aussi nous allons la résumer ici.

Le premier relais de l'information olfactif, équivalent du BO, est le lobe antennaire (AL). Il est composé de cellules relais, les neurones de projection (PN), et d'interneurones, les neurones locaux, (LN), équivalents respectivement des cellules M/T et des GC du bulbe olfactif. Le nombre de ces cellules est estimé à 700 pour les PN et 300 pour les LN. Enfin la seconde structure olfactive chez l'insecte, recevant l'information en provenance du LA est le corps pédonculé (MB), dont les neurones principaux sont les cellules de Kenyon (KC).

1.4 Le codage spatial.

1.4.1 Le répertoire des récepteurs olfactifs et les connexions au bulbe.

L'APPAREIL SENSORIEL OLFACTIF chez le mammifère commence avec la cavité nasale, délimitée chez l'homme par l'orifice piriforme dans sa partie antérieure, par le pharynx dans sa partie postérieure, par l'os ethmoïde en dorsal et le palais en ventral. Chez l'homme et les primates, cette cavité nasale est un vaste espace segmenté par trois parois osseuses délimitant trois chambres, ou cornets olfactifs (voir figure 1.11), et séparé dans

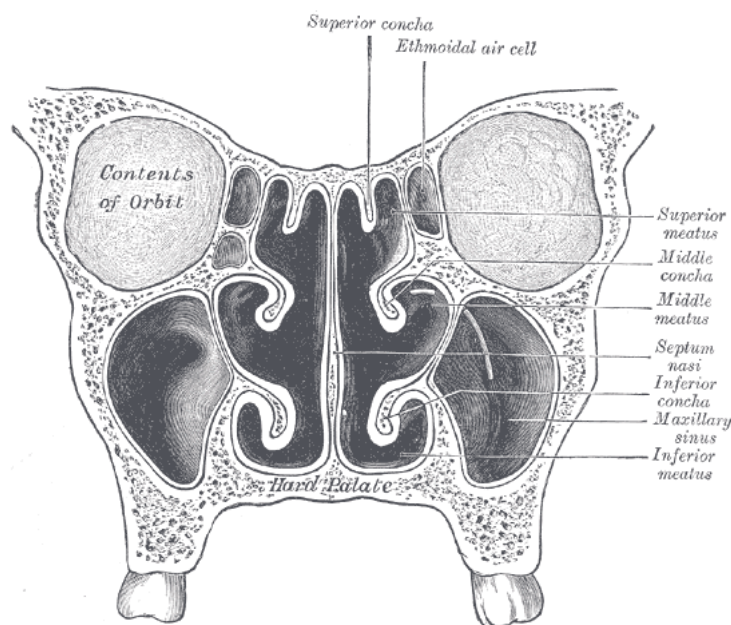


FIG. 1.11: Coupe coronale des cavités nasales chez l'homme

sa ligne médiane par le septum nasal. Les parois de la cavité sont tapissées par la lamina propria, un épithélium contenant entre autre les cellules à gobelet, sécrétrices de mucus. La configuration des cornets assure une circulation turbulente de l'air dans la cavité nasale, permettant ainsi de réchauffer et d'humidifier l'air entrant le circuit respiratoire, de le filtrer – le mucus pouvant piéger de fines particules en suspension dans l'air – et, enfin, de le faire circuler dans le cornet supérieur dont l'aspect le plus dorsal contient l'épithélium olfactif. Cette morphologie générale se retrouve chez tous les mammifères, avec cependant des différences marquées dans l'architecture des cornets. Première différence :

chez le rongeur, les parois osseuses sont plus grandes et plus ramifiées que chez l'homme, ayant pour résultat un plus grand nombre de cornets de forme et d'accessibilité variable (voir figure 1.12), ce qui aura une incidence particulière sur la circulation de l'air dans

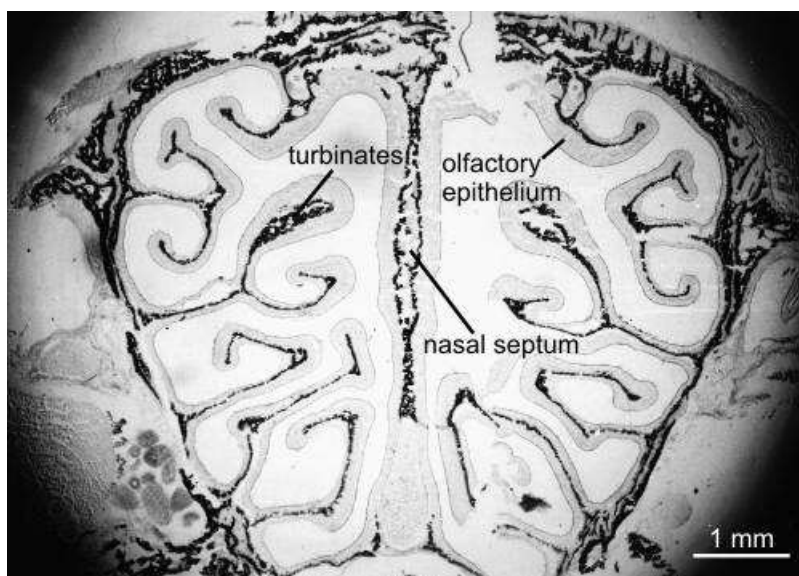


FIG. 1.12: Coupe coronale des cavités nasales chez le rat

la cavité nasale. Autre différence majeure : la répartition de l'épithélium olfactif, puisque chez le rongeur – mais aussi les félins, canins, lagomorphes, etc. – il n'est pas confiné sur une surface restreinte mais tapisse l'ensemble de la cavité. Les nombreuses circonvolutions des cornets permettent donc d'augmenter la surface de contact entre l'air entrant et le tissu sensoriel. On estime que l'épithélium olfactif représente une surface de 2 à 4 cm² chez l'homme contre 20cm² chez le chat ou 150cm² chez le chien. (Allison, 1953a).

L'épithélium olfactif contient trois types majoritaires de cellules : les cellules basales, les cellules de soutien et les cellules sensorielles olfactives. Les cellules basales sont des cellules souches qui vont produire de nouvelles cellules sensorielles tout au long de la vie de l'organisme (Graziadei and Graziadei, 1979; Moulton and Beidler, 1967). Les cellules de soutien donnent sa structure à l'épithélium et forment des jonctions serrées à leur pôle apical. Les cellules sensorielles olfactives sont des neurones bipolaires, traversant l'épithélium, émettant un axone à leur pôle basal et un appareil dendritique à leur pôle apical sous la forme de prolongements ciliés (voir figure 1.13). Les axones émis par les neurones vont former des faisceaux traversant l'os ethmoïde au niveau de la lame criblée et rejoindre les bulbes olfactifs (OB), premiers centre de traitement de l'information olfactive dans le système nerveux central. L'épithélium olfactif comporte aussi des

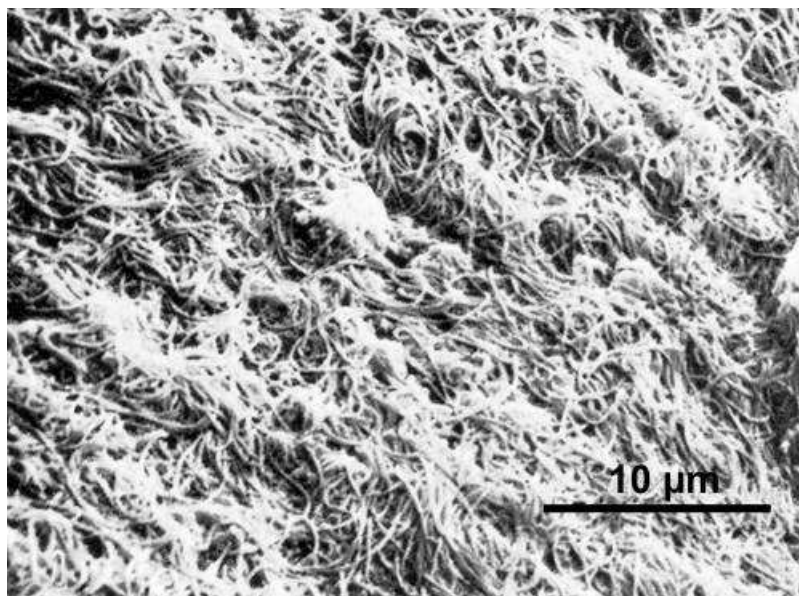


FIG. 1.13: Photographie en microscopie électronique des cils olfactifs tapissant la cavité nasale

glandes de Bowman sécrétant le mucus dans lequel vont baigner les cils. Les récepteurs olfactifs (OR) sont enchâssés dans la membrane des cils. Ce sont des protéines à sept domaines transmembranaires, appartenant à la super-famille des récepteurs couplés aux protéines G et issus d'une même super-famille de gènes (Buck and Axel, 1991). La liaison d'une molécule odorante sur un récepteur spécifique va activer la protéine G qui va à son tour activer l'adénylate cyclase et résulter en une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. Cette augmentation de concentration va déclencher l'ouverture de canaux sodiques, conduisant à une modification du potentiel de membrane du neurone et à l'émission d'un potentiel d'action. Pour comprendre le principe de transduction de l'information olfactive, il faut d'abord répondre à un certain nombre de questions, à savoir

- a) le domaine de spécificité des récepteurs olfactifs : quels sont les éléments du signal chimique qui vont être capables de former une liaison avec les OR ;
- b) l'expression des OR par les neurones sensoriels olfactifs : tous les OR sont-ils représentés de façon égale en nombre, sont-ils répartis aléatoirement sur la surface de l'épithélium, combien de récepteurs différents vont être exprimés par un neurone ;
- c) l'organisation des projections : quel est le plan d'organisation des faisceaux d'axones des neurones sensoriels olfactifs.

1.4.1.1 Le domaine de spécificité des récepteurs olfactifs.

LA FAMILLE DE GÈNES codant pour les récepteurs sensoriels olfactifs est supposée être une des plus grandes super-familles de gènes connues et pourrait coder jusqu'à 1000 récepteurs fonctionnels chez le mammifère (Buck and Axel, 1991; Buck, 1992; Levy et al., 1991; Parmentier et al., 1992). Sur ce répertoire il est estimé que seuls 300 récepteurs sont fonctionnels chez l'homme. Or une autre estimation indique que plus de 400 000 composés différents sont perçus par le nez humain comme ayant une odeur (Hamauzu, 1969), soit plus de mille fois le répertoire de récepteurs disponible. Cela suggère qu'une odeur ne va pas activer un seul récepteur, mais une combinaison de récepteurs. Pour étudier la spécificité des OR, plusieurs équipes se sont basées sur une autre particularité du système olfactif : de nombreux travaux sur les récepteurs olfactifs, en partie initiés par Linda Buck, indiquent que le nombre de gènes exprimés dans un même neurone est faible (Ngai et al., 1993), Chess et al. (1994) montrent que l'expression d'un allèle d'un OR inactive l'expression des autres gènes dans le même neurone et Serizawa et al. (2000), enfin, en incluant des marqueurs fluorescents dans deux récepteurs différents constatent qu'ils ne sont jamais exprimés dans le même neurone. Il devient ainsi évident qu'un neurone sensoriel olfactif n'exprime qu'un seul type de récepteur olfactif, et que l'on peut donc étudier le taux d'activation d'un OR en enregistrant le taux d'activité du neurone exprimant cet OR. Partant de ce principe, Zhao et al. (1998) utilisent l'enregistrement l'électro-olfactogramme (EOG) de rats transfectés par un plasmide contenant le gène d'un OR particulier. Après transfection, les animaux vont surexprimer ce récepteur particulier avec pour résultat une augmentation de l'activité EOG en réponse à un groupe restreint de molécules odorantes seulement, confirmant ainsi qu'un même récepteur est activé par plusieurs odeurs. À l'inverse, en utilisant une approche différente combinant imagerie calcique et RT-PCR, Malnic et al. (1999) montrent qu'une même molécule odorante active plusieurs OR, et que deux molécules possédant deux structures très proches vont activer deux sous-ensembles d'OR proches mais jamais identique. Enfin, revenant à l'enregistrement EOG, Araneda et al. (2000) étudient un OR bien précis (I7) et montrent que celui-ci ne peut être activé que dans certains cas : le ligand doit obligatoirement comporter un groupe fonctionnel aldéhyde, l'encombrement stérique autour de ce groupe doit être réduit, et le nombre total de carbones du ligand doit-être compris entre 7 et 11. Pourvu que ces restrictions soient respectées, n'importe quelle molécule sera capable d'activer ce récepteur I7.

Tous ces éléments confirment l'existence d'un codage combinatoire des odeurs au niveau de l'épithélium olfactif : une odeur activera plusieurs récepteurs et un récepteur sera activé par plusieurs odeurs (cf. figure 1.14 : représentation schématique du codage com-

binatoire, l'ensemble des particularités structurales sera représentée par un ensemble de récepteurs olfactifs). Chaque récepteur olfactif détectera une particularité structurale bien

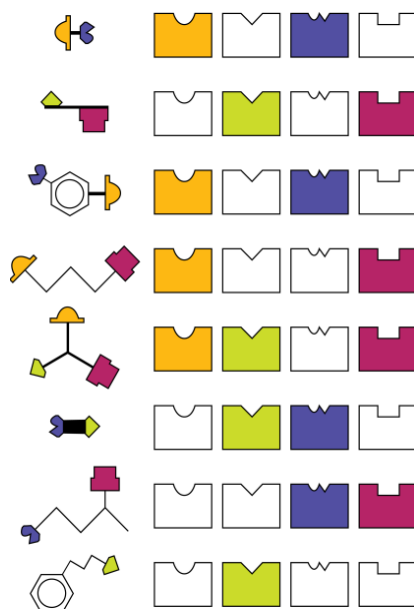


FIG. 1.14: Le codage combinatoire des molécules olfactives (d'après Malnic et al. 1999)

Chaque molécule odorante (à gauche) possède un ensemble de traits moléculaires et vont activer une combinaison de récepteurs (à droite) spécifiques à chacun de ces traits. Cette combinaison permet la représentation de l'odeur.

précise de l'information olfactive, et c'est la combinaison de l'ensemble des récepteurs activés qui contient la représentation de l'information olfactive.

1.4.1.2 L'expression des récepteurs olfactifs.

NOUS AVONS VU QU'IL EXISTE UN RÉPERTOIRE d'environ un millier de gènes codant pour les récepteurs olfactifs, mais l'expression de chaque gène est-elle anarchique ou suit-elle des règles d'organisation strictes ? Une première étude menée chez le poisson (Ngai et al., 1993) montre que la localisation de l'expression ne suit pas de règle précise et qu'un OR peut-être indifféremment exprimé en tous points de l'épithélium olfactif du poisson. En contrepartie, le poisson semble n'être capable de détecter qu'un nombre d'odeurs beaucoup plus restreint que le mammifère. Qu'en est-il donc de la répartition des récepteurs chez ce dernier ? Le séquençage des gènes codant pour les OR ayant permis de créer des sondes associées, la technique d'hybridation in situ a été largement em-

ployée pour cette étude (Nef et al., 1992; Ressler et al., 1993; Strotmann et al., 1994; Vassar et al., 1993). Il en ressort que l'épithélium olfactif peut-être divisé en trois grandes zones d'expression, ainsi qu'une quatrième zone plus réduite, organisées symétriquement et suivant l'axe dorso-ventral de la cavité nasale. Ces domaines sont exclusifs : les récepteurs qui y sont exprimés ne le seront pas dans les trois autres. À l'intérieur de ces domaines, en revanche, l'organisation de l'expression est semblable à celle que l'on retrouve chez le poisson, c'est à dire sans organisation spatiale apparente. L'expression des récepteurs sur l'épithélium suit donc une organisation spatiale grossière, avec seulement 4 zones pour 1000 récepteurs. Cependant la comparaison entre le système olfactif du mammifère et celui du poisson suggère que cette spatialisation de l'expression va de pair avec une augmentation des performances du système. Pour poursuivre dans ce sens, il faut se demander si on retrouve une organisation spatiale dans les projections entre l'épithélium et le bulbe olfactif.

1.4.1.3 Organisation des projections.

LA CONNEXION entre l'épithélium olfactif et le système nerveux central est assurée par les faisceaux que forment les axones émis par les neurones sensoriels, traversant la lame criblée pour rejoindre le bulbe olfactif. Des études basées sur l'utilisation de traceurs rétrogrades combinés à la HRP (Astic and Saucier, 1986; Astic et al., 1987; Saucier and Astic, 1986), sur l'hybridation in situ (Vassar et al., 1994) ou utilisant des animaux transgéniques (Mombaerts et al., 1996) ont permis d'établir l'organisation de cette connexion. Le point d'entrée dans le bulbe olfactif est le glomérule, une structure particulière où se fait la synapse entre le neurone sensoriel et les neurones relais du bulbe olfactif. Il s'avère que tous les axones émis par les neurones sensoriels exprimant un même récepteur olfactif vont converger vers un ou au plus deux glomérules. (cf figure 1.15). Ainsi, l'ébauche d'organisation spatiale rencontrée dans l'expression des récepteurs olfactifs se prolonge dans l'organisation des voies efférentes de l'épithélium.

L'appareil sensoriel olfactif dispose d'un imposant répertoire de récepteurs olfactifs, chacun étant sensible à une particularité structurelle des molécules odorantes : un groupement fonctionnel, un cycle aromatique, une ramification de la chaîne carbonée ; mais aussi des particularités physiques : taille, encombrement stérique, charge etc. Chaque neurone sensoriel de l'épithélium olfactif ne va exprimer qu'un seul type de ces récepteurs, créant ainsi une superposition parfaite entre la spécificité des récepteurs et la spécificité des neurones sensoriels. Cette information est ensuite projetée vers le bulbe olfactif, suivant un schéma d'organisation stricte, de manière à ce que la spécificité de l'épithélium

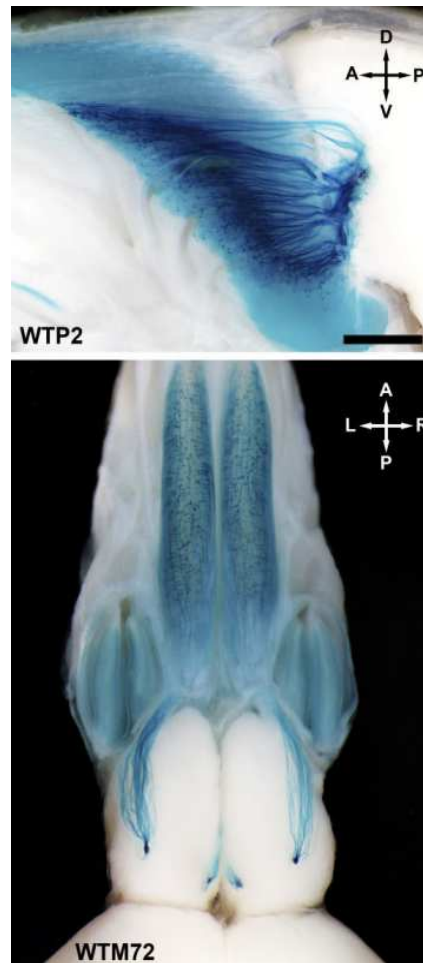


FIG. 1.15: Marquage des projections des neurones sensoriels exprimant le même type de récepteur vers une paire de glomérules symétriques. Source : Biju et al. 2008

soit conservée à l'entrée du bulbe : tous les neurones sensoriels portant un même type de récepteur vont converger sur un même glomérule. De cette façon, l'activité au niveau d'un glomérule donné signifie la détection par l'épithélium olfactif d'une particularité physique ou structurale donnée du stimulus olfactif.

Nous avons vu précédemment que l'appareil sensoriel avait généralement comme tâche de décomposer le stimulus en une ou plusieurs dimensions, permettant ainsi la représentation de cette information sensorielle dans les dimensions de l'espace neuronal. Le cas du système olfactif ne semble, à première vue, pas déroger à ce principe : schématiquement, l'épithélium olfactif dresse une liste de l'ensemble des particularités structurales et physiques du stimulus et utilise la couche glomérulaire du bulbe olfactif pour représenter

cette liste dans un espace à deux dimensions. Cependant, une différence fondamentale subsiste : si les sens physiques ont recours à une représentation topographique de la dimension spatiale du stimulus (deux sources lumineuses proches dans l'espace activeront des zones proches du cortex visuel primaire, deux sons de fréquence éloignées activeront des zones éloignées du cortex auditif primaire), il n'en va pas de même pour la représentation du stimulus olfactif. Dans cette modalité, deux glomérules voisins ne vont pas du tout nécessairement être stimulés par des molécules aux caractéristiques semblables. Le rapport entre caractéristiques du stimulus et activation spatiale du bulbe est développé dans le paragraphe suivant.

1.4.2 La carte glomérulaire

AFIN DE COMPRENDRE la relation exacte entre le stimulus et l'activation glomérulaire, trois techniques au moins ont été utilisées par deux équipes principalement chez le mammifère. Le principe est le même dans tous les cas : un animal est soumis à une stimulation par une molécule unique et connue, de concentration généralement assez intense, et l'activité résultante de la couche glomérulaire est enregistrée. Les techniques utilisées pour enregistrer cette activité sont l'imagerie par $[^{14}\text{C}]$ -2-déoxyglucose ($[^{14}\text{C}]$ 2-DG), l'imagerie optique du signal intrinsèque et l'enregistrement extracellulaire. La technique d'imagerie par $[^{14}\text{C}]$ 2-DG (Sokoloff et al., 1977) s'appuie sur le postulat qu'une augmentation d'activité dans le tissu nerveux s'accompagne d'une augmentation du métabolisme et donc d'une augmentation de la concentration de glucose. Le $[^{14}\text{C}]$ 2-DG est une molécule de glucose légèrement modifiée et marquée radioactivement qui sera internalisée par les neurones en même temps que le glucose et s'accumulera dans le cytoplasme, proportionnellement à l'activité du neurone. Un animal injecté avec du $[^{14}\text{C}]$ 2-DG et soumis à une stimulation olfactive prolongée (45 minutes) accumulera donc cette molécule au niveau de la couche glomérulaire. La révélation par autoradiographie des zones marquées fournira une carte spatiale des glomérules activés par l'odeur (Jourdan et al., 1980).

L'imagerie optique du signal intrinsèque repose sur les modifications des tissus du bulbe liées à leur activité (modification du volume des vaisseaux sanguin, réactions métaboliques diverses impliquant l'hémoglobine et d'autres molécules possédant des propriétés de fluorescence (Lieke et al., 1989)) et résultant en un changement dans les propriétés de réflexion de la lumière dans certaines longueurs d'ondes. En utilisant une caméra et une source de lumière adaptées on peut filmer en temps réel l'activité de la couche glomérulaire du bulbe olfactif en réponse à des stimulations odorantes courtes (10 secondes) et

surtout la méthode permet d'utiliser plusieurs odeurs différentes chez un même animal (Rubin and Katz, 1999). Les enregistrements électrophysiologiques consistent simplement à placer une électrode dans le bulbe olfactif et mesurer l'activité des cellules mitrales et cellules à panache (M/T) lors de la stimulation odorante. On rapporte ensuite la position de l'électrode au stimulus évoquant une activité dans la cellule enregistrée. Si cette méthode est la plus directe, elle est aussi la plus fastidieuse. Aussi, pour ne pas procéder au hasard, l'équipe de Kensaku Mori part du postulat qu'il existe une continuité entre l'espace olfactif et l'espace glomérulaire et que donc des odeurs de structures similaires vont activer des zones proches. Ils établiront donc des gradients moléculaires : un set de molécules ne variant entre elles que par un seul paramètre, par exemple le nombre de carbones ou bien le numéro du carbone portant le groupe fonctionnel. Ils montrent, chez le lapin, que les cellules M/T possèdent un champ récepteur moléculaire (MRR), par analogie avec le champ récepteur visuel des cellules ganglionnaires de la rétine ou le champ récepteur somesthésique des récepteurs cutanés. Une cellule mitrale activée lors d'une stimulation avec un aldéhyde ne va pas réagir avec la même intensité selon la longueur de la chaîne carbonée, suivant le profil en cloche classique dans les autres modalités (voir figure 1.16). Selon les cellules, le MRR ne varie pas uniquement suivant la longueur de chaîne, mais aussi selon le groupe fonctionnel (alcool, acide, cétone...) porté par la molécule ainsi que la position de ce groupe sur la chaîne carbonée. Enfin, l'amplitude de la courbe de réponse augmente en raison de la concentration de l'odeur (Imamura et al., 1992). Ces résultats obtenus avec des molécules aliphatiques sont également vrais pour les molécules dont le squelette carboné forme un cycle de type benzène. Les mitrales activées par ces odeurs vont varier selon le groupe fonctionnel porté par ces molécules aromatiques. Si le cycle porte plusieurs groupes fonctionnels, leur disposition ortho, méta ou para aura son incidence sur le MRR, si le cycle est porteur d'une chaîne aliphatique, le MRR va varier avec sa longueur, et ainsi de suite (Kato et al., 1993). Enfin, les molécules éloignées du sommet de la courbe de réponse peuvent évoquer non pas une activation mais une inhibition des M/T, suggérant que la stimulation active certaines cellules mais peuvent également inhiber d'autres cellules selon un principe d'inhibition latérale (Mori, 1995), dont nous reparlerons en détail plus tard.

L'imagerie par [^{14}C]2-DG permet d'obtenir de véritables cartes d'activation du bulbe et sont donc bien plus indiquées que les enregistrements extracellulaires pour établir une relation précise entre les particularités structurales des odeurs et la spatialisation de l'activité glomérulaire. M.M. Johnson et Leon se sont attelés à cette tâche chez le rat en utilisant un panel de 54 odeurs et ont pu établir l'existence de modules glomérulaires, c'est à dire des zones caractéristiques de la surface du bulbe dont l'activation peut-être rattachée à

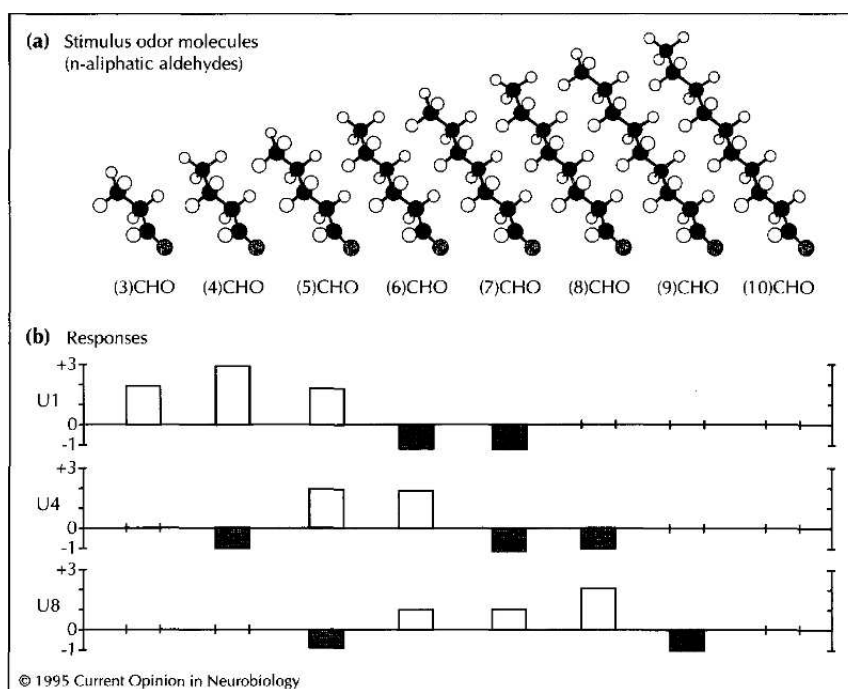


FIG. 1.16: Champ récepteur moléculaire pour trois cellules mitrales.

a : Aldéhydes de longueur de chaîne croissante

b : Réponse de trois cellules mitrales différentes

Source : Mori 1995

telle ou telle particularité moléculaire. Les cartes qu'ils obtiennent sont reproductibles entre animaux et entre essais, elles montrent que leur complexité augmente avec la taille des molécules utilisées et que si deux molécules différentes peuvent activer des modules communs, elles vont également activer chacune un module propre (Johnson et al., 1998, 2002). Ils établissent que des molécules possédant des structures proches activent des modules proches et que la spécificité modulaire est basée sur le groupe fonctionnel, principalement ceux basés sur l'oxygène (alcools, esters, cétones, aldéhydes, acides carboxyliques), mais aussi sur la structure du squelette carboné (longueur de chaîne, position du groupe, présence d'un cycle) (Johnson et al., 2005). Ils montrent également que le degré de spécificité est variable selon les modules : si certains modules ne vont réagir qu'aux esters, d'autres modules peuvent réagir aux cétones mais aussi aux cycles aromatiques et à certains alcools secondaires (Johnson et al., 2005). D'autres modules, principalement dans la zone ventrolatérale du bulbe, ont également été montrés comme complètement aspécifiques aux groupes fonctionnels tandis qu'ils se révèlent très spécifiques à la forme du squelette carboné et vont par exemple être activés spécifiquement par les cycles aro-

matiques ou les terpènes et autres camphrés. Ces résultats ont cette fois été obtenus en imagerie optique du signal intrinsèque chez le rat par l'équipe de Mori (Igarashi and Mori, 2005). La figure 1.17 résume les résultats obtenus par les deux équipes. La comparaison entre les deux est difficile du fait des différentes nomenclatures de modules et des différences entre odeurs utilisées par chacun. On retrouve cependant de nombreuses similitudes : les modules associés aux aldéhydes et alcools situés en position antérieure de l'aspect dorso-latéral du bulbe (modules b chez Johnson et B chez Mori) ; un module postérieur de l'aspect dorsal activé par les cétones, les cétones aromatiques et les cycles aromatiques sans groupes fonctionnels (modules c chez Johnson et D chez Mori) ; les modules ventraux spécifiques des structures cycliques (j et k chez Johnson, H et I chez Mori), pour ne citer que quelques exemples. Notons que les cartes en [^{14}C]2-DG montrent une forte symétrie plane entre les aspects latéral et médian du bulbe olfactif, chaque aspect semblant posséder au même endroit des modules portant la même spécificité. Cette symétrie a été étudiée par Inaki et al. (2002) en cartographie Zif268 (cette technique, comparable à la cartographie [^{14}C]2-DG, permet une mesure de l'activité cellulaire via l'expression de gènes précoces) chez la souris et confirme les études en traçage (voir plus haut) rapportant que les axones des neurones olfactifs convergent vers deux glomérules symétriquement disposés de part et d'autre du bulbe.

Nous pouvons donc distinguer trois grandes classes de caractéristiques moléculaires qui vont conduire à des activations modulaires spécifiques de la couche glomérulaire du bulbe olfactif : le groupe fonctionnel, la structure de la chaîne carbonée (incluant la position du groupe sur cette chaîne) et la configuration aliphatique, cyclique ou aromatique. On ne sait cependant pas si ces classes sont traitées de façon indépendante. Un élément de réponse est donné par Uchida et al. (2000) montrant en imagerie intrinsèque que le groupe fonctionnel active de grands modules composés de sous-modules, les différents sous-modules étant spécifiques d'une longueur de chaîne particulière, de la position du groupe, de la présence de doubles liaisons etc., donc spécifiques d'une structure de chaîne donnée (ce résultat se retrouve également dans certains modules cartographiés par Johnson et al.).

Groupe fonctionnel et structure de chaîne constitueraient donc respectivement une caractéristique principale et une caractéristique secondaire de l'odeur. Ce résultat est particulièrement intéressant puisque les auteurs (Uchida et al., 2000) le rapprochent de la perception de la qualité de l'odeur, c'est à dire les impressions évoquées par le stimulus chez un sujet humain. Les molécules possédant des groupes fonctionnels différents seront classées comme appartenant à des catégories d'odeur différentes par les sujets, les esters sont souvent catégorisés comme des odeurs de fruits ou de confiserie tandis que les

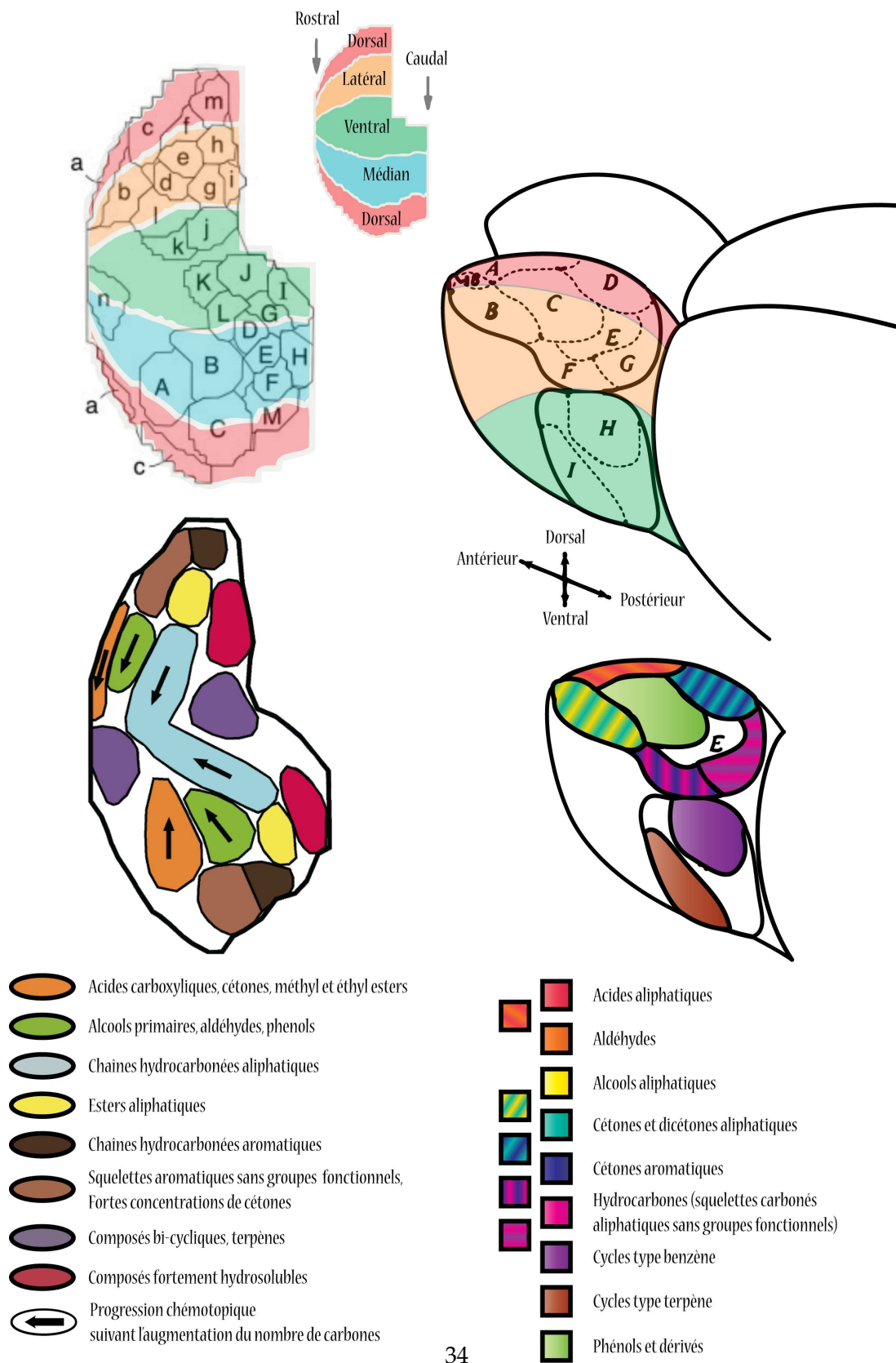


FIG. 1.17: Cartes de spécificité modulaire de la couche glomérulaire du bulbe olfactif, selon Johnson (à gauche) et Mori (à droite)

acides gras sont classés comme des odeurs animales souvent désagréables. Le classement de plusieurs acides gras de longueurs différentes va glisser progressivement de âcre et suffocant à rance et huileux à mesure que la chaîne carbonée s'allonge. Ainsi les caractéristiques principales et secondaires des molécules peuvent correspondre à un classement principal et un classement secondaire de la qualité perçue de l'odeur. C'est là le premier exemple d'un rapprochement entre la représentation spatiale de l'information olfactive et un traitement cognitif avancé de cette représentation.

1.4.3 Les limitations du codage spatial.

LES RÉSULTATS PRÉSENTÉS ICI sont pour l'essentiel issus d'enregistrements électrophysiologiques, spatialement peu précis, et de cartographies en [¹⁴C]2-DG qui malgré leur bonne résolution spatiale présentent un défaut majeur : la nécessité d'une stimulation olfactive très prolongée. Replacé dans son environnement naturel, le rat est capable de détecter et d'adapter son comportement en fonction d'un grand nombre de stimulus tels que l'odeur de ses congénères, de prédateurs, de sources de nourriture, parfois le tout en même temps, et toujours avec le bruit de fond olfactif des odeurs perçues par l'animal mais n'ayant pas de signification écologique. Non seulement l'animal est capable de percevoir et distinguer toutes ces odeurs, mais il est surtout capable de faire tout cela en un temps très limité, environ 100 à 200 ms (Goldberg and Moulton, 1987; Uchida and Mainen, 2003; Abraham et al., 2004; Wesson et al., 2008). On est alors bien loin des 45 minutes nécessaires pour obtenir la carte de l'activation glomérulaire par une seule odeur. Qu'en est-il donc de la spatialisation fonctionnelle de l'activité bulbaire à des échelles de temps très courtes ? D'autres part, si le détail de la représentation de l'information olfactive réside dans le contour des cartes d'activation glomérulaire, la ségrégation spatiale de l'activité doit être conservée de façon stricte lors de son acheminement entre le glomérule et les structures de lecture de cette information (amygdale, cortex piriforme, etc.). Or deux particularités des cellules mitrales vont à l'encontre d'une transmission unidirectionnelle de l'information : l'étendue de l'arborisation dendritique secondaire de ces cellules (voir figures 1.8, page 15 et 1.18), et la rétropropagation des potentiels d'action dans ces dendrites (Margrie et al., 2001). L'activation d'un glomérule va entraîner l'excitation d'environ 75 cellules M/T et donc potentiellement la propagation d'une excitation dans un large volume du bulbe olfactif via les processus dendritiques secondaires de ces cellules. Cette transmission latérale perturbe dans une certaine mesure l'image formée au niveau de la couche glomérulaire. Pour établir le lien entre l'activité glomérulaire et l'activité des

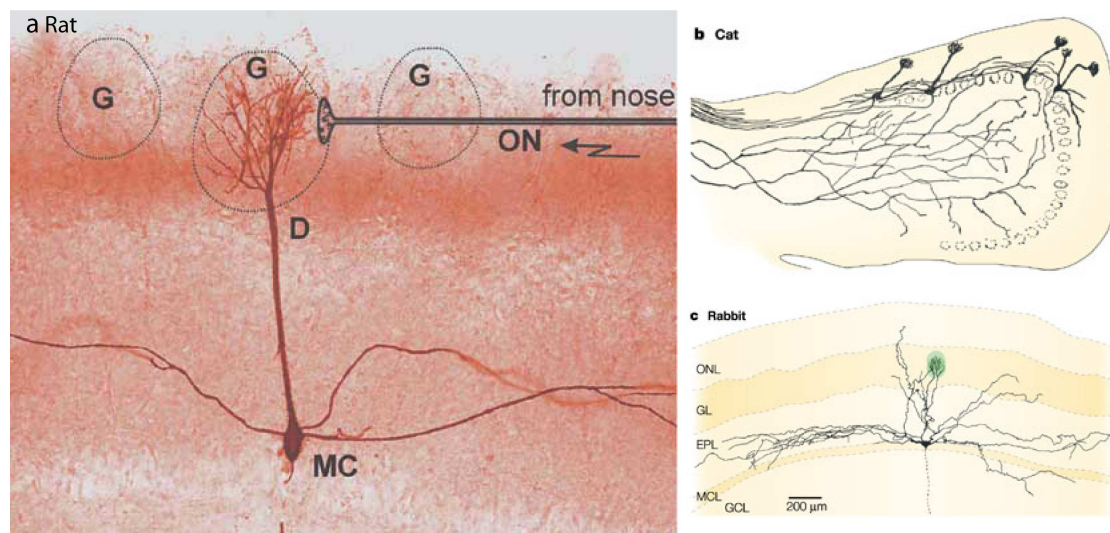


FIG. 1.18: Arborisations dendritiques primaires et secondaires des cellules mitrales.

a : chez le rat ; b : chez le chat ; c : chez le lapin

G : glomérules, D : dendrite primaire, MC : cellule mitrale

Source : Laurent 2002

cellules mitrales et à panache à une échelle de temps courte, Luo and Katz (2001) ont combiné enregistrements électrophysiologiques intracellulaires et imagerie optique du signal intrinsèque. Ils rapportent que lorsque les glomérules sont inclus dans la zone activée par une stimulation olfactive, les cellules M/T dont l'extrémité apicale est située dans ces glomérules répondent à la stimulation par une excitation, souvent suivie par une inhibition lors de l'arrêt de la stimulation. Au contraire, les cellules M/T dont l'extrémité apicale est située dans des glomérules proches, mais en dehors de la surface glomérulaire activée par l'odeur, sont marquées par une inhibition puis une excitation, respectivement au début et à l'arrêt de la stimulation. Ils montrent donc que s'il existe une corrélation entre l'activité glomérulaire enregistrée par les méthodes optiques et l'activité conséquente des cellules M/T, cette corrélation varie dans le temps. Ce résultat peut-être rapproché de la constatation faite par Mori que la stimulation par une molécule en limite du champ récepteur moléculaire d'une cellule M/T pouvait résulter en une inhibition de celle-ci (Mori, 1995). Cela correspondrait probablement à un cas où la molécule utilisée active un glomérule voisin de celui auquel la cellule M/T enregistrée est connectée. Le mécanisme par lequel l'activation d'un glomérule résulte en une inhibition des cellules M/T reliées aux glomérules voisins est décrit par Yokoi et al. (1995) et repose fondamentalement sur les synapses dendro-dendritiques entre les cellules mitrales et les cellules granulaires de la couche granulaire du bulbe olfactif (voir section anatomie, page 17). La propagation d'un

potentiel d'action le long des dendrites secondaires d'une cellule mitrale entraîne une activation glutamatergique des cellules granulaires qui vont répondre par une inhibition GABAergique des cellules mitrales. Yokoi conclut que ce mécanisme permet d'augmenter le contraste local entre les glomérules activés spécifiquement par l'odeur et les autres glomérules activés plus faiblement car moins spécifiques. Luo et Katz concluent quand à eux que le champ récepteur des cellules M/T est de type centre-pourtour, en rapprochement avec les cellules ganglionnaires de la rétine, et permet de resserrer la zone activée par une odeur avec pour effet de réduire le recouvrement entre les zones activées par deux odeurs différentes. Ces deux conclusions très proches vont dans le sens de la représentation spatiale de l'information olfactive, mais décalent celle-ci du niveau glomérulaire vers les deutoneurones bulbaires qui ne sont donc plus cantonnées à un simple rôle de cellules relais.

Cependant, ces phénomènes ont tous été étudiés chez des animaux anesthésiés chez qui le rythme respiratoire est stable et lent. Des enregistrements unitaires multiples chez l'animal vigile, ici un rat se comportant de façon naturelle dans une cage hermétique où circule un flux d'air odorisé, montrent que, si l'on retrouve une organisation régionalisée pour des respirations lentes, l'augmentation de la fréquence respiratoire fait augmenter très fortement la variabilité des réponses cellulaires, diminuant d'autant la spécificité de l'activité spatiale (Bhalla and Bower, 1997). Une autre étude, comparant les enregistrements effectués chez une même population de souris, tantôt éveillées tantôt anesthésiées, en réponse aux mêmes odeurs, conclut que seuls 27% des cellules mitrales activées pendant l'anesthésie le seront également chez l'animal vigile (Rinberg et al., 2006). Ces deux résultats tendent cette fois à diminuer l'importance du codage spatial dans la représentation de l'information olfactive au niveau bulbaire. Cependant, l'étude qui porte le coup le plus sérieux à la notion du codage spatial a été réalisée en 1997 par B. Slotnick. Le principe de l'étude est de supprimer spécifiquement la zone du bulbe activée par une odeur particulière et de mesurer si l'animal est toujours capable de percevoir cette odeur. Pour ce faire, un groupe d'animaux est entraîné à réaliser une tâche de discrimination olfactive type go/no-go (deux odeurs différentes peuvent être délivrées, une seule de ces odeurs, l'odeur dite renforcée, est associée à une récompense entraînant une réaction comportementale de la part de l'animal) avant d'être séparé en un lot contrôle et un lot test. Le lot test subit une opération chirurgicale au cours de laquelle une zone spécifique du bulbe est détruite par aspiration. La zone détruite est celle activée par l'acide propionique, telle que mesurée en cartographie [¹⁴C]2-DG. Le groupe contrôle subit la même opération mais sans destruction. L'acide propionique a été choisi car le foyer d'activation associé est assez restreint et localisé en dorsal donc facilement accessible chirurgicalement. Après récupé-

ration, les deux lots d'animaux sont de nouveau soumis à la tâche comportementale mais avec deux odeurs différentes, l'odeur renforcée étant l'acide propionique. À la grande surprise des auteurs, les performances de détection et de discrimination de l'acide propionique du groupe test n'étaient pas différentes de celles du groupe contrôle (Slotnick et al., 1997). Pour pousser ce travail plus avant, il refirent à peu près la même expérience, mais en utilisant quatre odeurs renforcées différentes et en détruisant des portions de bulbe sans restriction de localisation ni d'étendue (les lésions portent sur un seul bulbe, l'autre étant entièrement réséqué). Encore une fois, les performances entre le groupe contrôle et le groupe test n'étaient pas différentes, indépendamment de l'odeur, de la localisation de la lésion et de son importance, pourvu que 20% au moins du bulbe soient laissés intacts (Lu and Slotnick, 1998). Le premier résultat montre que la zone glomérulaire qui, en cartographie [^{14}C]2-DG, est la plus activée par une odeur n'est pas nécessaire pour permettre une représentation correcte de cette l'information olfactive. Le deuxième résultat suggère non seulement que seul un cinquième du bulbe est suffisant pour représenter correctement l'information olfactive mais également qu'il peut s'agir de n'importe quel cinquième et que toute dimension spatiale est donc superflue. Il convient toutefois de nuancer ces résultats : les animaux dans les deux groupes sont extrêmement entraînés à la tâche (plusieurs centaines d'essais dans les jours précédant la chirurgie) et d'autre part les odeurs employées ont une composante trigéminal non-négligeable, qui peut être employée par l'animal pour améliorer ses performances. Sur des animaux moins entraînés, avec d'autres odeurs et d'autres types de tests, les résultats seraient probablement différents. Ces résultats, bien que contestables, jettent néanmoins le doute sur la nature purement spatiale du codage olfactif. L'explication la plus probable est que l'information olfactive est un phénomène largement distribué dans le bulbe. Cela est confirmé par de nombreuses études réalisées en imagerie optique avec colorants sensibles au voltage, technique possédant une très bonne résolution temporelle et qui montre que la stimulation olfactive évoque de nombreux foyers d'activité, largement répartis sur la surface du bulbe olfactif et donc bien moins spatialement ségrégués que ce qui est indiqué par les techniques d'imagerie en [^{14}C]2-DG (Cinelli et al., 1995; Kauer, 1991; Kauer and Cinelli, 1993).

Finalement, on ne peut exclure qu'il existe à la surface du bulbe olfactif des cartes d'activité dont les contours sont étroitement liés aux caractéristiques fonctionnelles et structurales des odeurs. Toutefois on ne peut plus affirmer que ces cartes servent de support au codage de l'odeur, ou tout du moins pas de façon exclusive. On peut spéculer que l'apparition d'une odeur va évoquer dans le bulbe olfactif une activité qui sera d'abord très distribuée pendant quelques dizaines ou centaines de millisecondes puis que cette acti-

vité va petit à petit se régionaliser, devenir plus intense dans certaines zones bien définies du bulbe et disparaître partout ailleurs, et finir par prendre un aspect spatial stéréotypé. Dans cette situation, le codage spatial pourrait servir à la représentation à long terme d'odeurs présentes de façon prolongée dans l'environnement olfactif de l'animal, tandis qu'une autre stratégie de codage, basée sur un signal largement distribué, serait mise en œuvre pour les représentations à très court terme.

1.5 Le codage temporel

À PARTIR DU MOMENT OÙ L'ON ADMET que la perception d'une odeur ne va pas aboutir à une représentation figée mais à une réponse évoluant dans le temps, on quitte le domaine spatial pour aborder le concept de représentation spatio-temporelle. La représentation de l'information olfactive repose donc, pour une part qui reste à déterminer, sur des phénomènes dynamiques c'est à dire évoluant dans le temps.

Nous avons rapporté dans la section précédente un certain nombre d'études mettant la modification de la spécificité spatiale de la réponse aux odeurs en lien avec le fonctionnement des synapses dendro-dendritiques entre les cellules mitrales et les cellules granulaires. Nous avons également, au début de ce chapitre, rapporté que les enregistrements extra cellulaires dans le bulbe olfactif sont caractérisés par la prépondérance de rythmes, que ces rythmes sont des oscillations du champ électrique généré localement pas la somme de l'activité électrique synaptique, enfin que le bulbe olfactif est caractérisé par une importante densité synaptique, précisément entre les cellules mitrales et granulaires. Tous ces aspects caractéristiques peuvent être reliés logiquement entre eux de la façon suivante :

- a) la stimulation olfactive évoque une intense activité au niveau glomérulaire ;
- b) cette activité va se propager le long des dendrites principales des cellules à panache et des cellules mitrales et conduire à l'émission de potentiels d'action ;
- c) les potentiels d'action se propagent le long des dendrites secondaires des cellules mitrales, activant les nombreuses synapses dendro-dendritiques et laissant dans leur sillage une vague d'inhibition ;
- d) cette boucle d'interaction entre inhibition et excitation va modifier l'activité du bulbe et amener petit à petit à une représentation spatiale et temporelle de l'information olfactive.

Cette vaste activité synaptique va avoir comme corollaire des oscillations marquées des potentiels de champ locaux. Partant de ce principe, l'étude de ces oscillations, des événements qui leur sont liés et des phénomènes à leur origine peut renseigner sur les processus dynamiques impliqués dans la représentation de l'information olfactive.

Selon l'espèce étudiée, le modèle animal et le protocole expérimental employé, les rythmes que l'on enregistre dans le système olfactif peuvent varier en fréquence, mais ils sont néanmoins toujours présents et associés à la perception d'une ou de plusieurs odeurs. Dans les années écoulées depuis les travaux d'Adrian, les recherches se sont poursuivies

sur le système olfactif du mammifère, mais également chez l'insecte et le poisson. L'insecte est un modèle intéressant car son système olfactif, quoique globalement similaire à celui des vertébrés, est plus simple et composé de peu de cellules. La difficulté technique de certains enregistrements électrophysiologiques, notamment les enregistrements intracellulaires, s'en trouve réduite d'autant. Cependant, les résultats obtenus sur ce modèle ne sont pas directement transposables au mammifère, la distance phylogénétique entre les deux est trop grande pour cela. Le poisson est un bon compromis car c'est un modèle plus proche du mammifère que ne l'est l'insecte, mais avec un bulbe olfactif contenant moins de cellules, donc possédant un réseau de connexion plus réduit et plus simple.

Aussi bien chez le poisson que chez l'insecte, donc, la stimulation olfactive va se traduire par l'apparition de rythmes dans le signal électrophysiologique. Le mécanisme générateur de ces rythmes sera abordé plus loin, nous allons simplement préciser ici un point de vocabulaire : ces rythmes, ou ondes, ou variations du potentiel de champ, ou variations de champ local, ou EEG correspondent à un même phénomène, ou ensemble de phénomènes, ayant suscité de nombreux travaux avant qu'un terme commun ne soit finalement adopté. Il est à présent largement admis que l'ensemble des courants ioniques générés par le fonctionnement synaptique crée un champ électrique local et que dans certaines conditions le potentiel électrique de ce champ local pourra varier de façon marquée. On parlera alors de variations ou d'oscillations des potentiels de champ locaux, ou local field potentials (LFP).

Reste enfin une question de fond qu'il faut aborder avant de poursuivre : est-ce que ces rythmes servent à quelque chose ? Le fait qu'un réseau de neurones actifs génère des oscillations du LFP ne signifie pas que ces oscillations jouent un rôle dans le fonctionnement du réseau. Après tout, le moteur d'une voiture est bruyant, mais ce n'est pas le bruit qui meut le véhicule. Une étude chez l'abeille apporte un élément de réponse (Stopfer et al., 1997) . Dans le corps pédonculé de l'abeille, les LFP présentent des oscillations rapides à environ 30 Hz, déclenchées par la présentation d'une odeur. L'abolition de ces oscillations suite à l'injection d'un agent pharmacologique approprié entraîne une diminution significative des performances de discrimination entre deux odeurs chimiquement proches chez ces insectes.

Cette étude suggère que la présence d'oscillations n'est pas une conséquence sans signification du fonctionnement du système olfactif, et qu'au contraire elles participent à la représentation du signal dans le cas d'une tâche de discrimination relativement difficile.

Dans la section suivante, nous allons présenter

- a) les caractéristiques des rythmes bulbaires, puis
- b) leurs mécanismes générateurs, ensuite nous aborderons

- c) le rôle de ces phénomènes dynamiques et enfin
- d) nous prendrons un peu de recul et étudierons la façon dont ces rythmes s'intègrent dans une représentation sensorielle évoluant dans le temps.

1.5.1 Caractéristiques des rythmes dans le bulbe olfactif.

IL CONVIENT EN PREMIER LIEU d'attirer l'attention sur l'existence de deux catégories de rythmes (cf. figure 1.19). Elles diffèrent de par leurs caractéristiques, leur rôle fonctionnel et vraisemblablement leurs mécanismes. Nous diviserons donc cette section en conséquence.

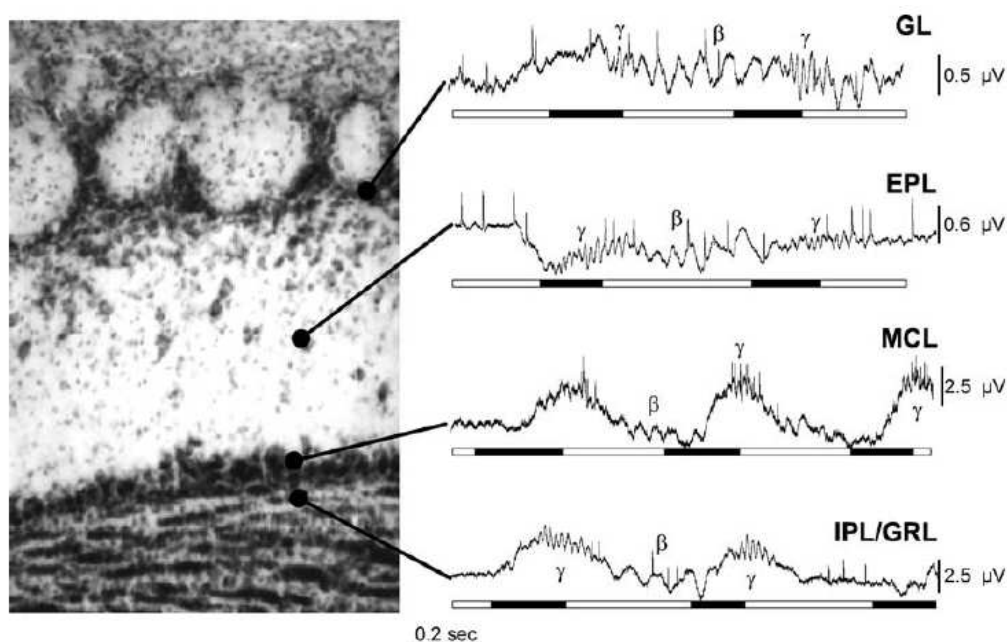


FIG. 1.19: Les rythmes caractéristiques de l'activité du réseau bulbaire chez le rat.

Gauche : coupe histologique du bulbe, coloration Cresyl Violet, montrant les couches glomérulaires (GL), plexiforme externe (EPL), mitrales (MCL) et plexiforme interne/granulaire (IPL/GRL).

Droite : haut, exemples d'enregistrements extracellulaires dans les différentes couches pendant la stimulation olfactive. On observe la modulation respiratoire du signal, ample et lente, sur laquelle s'ajoutent deux oscillations rapides, dans les bandes de fréquence bêta (β) et gamma (γ). En bas : cycle respiratoire de l'animal, les sections en noir indiquent les phases d'inspiration, les sections blanches les phases d'expiration.

Source : Buonviso et al. 2003

1.5.1.1 Les rythmes lents

Rythmes lents dans les potentiels de champs locaux Chez le mammifère la respiration va tour à tour charger la cavité nasale de composants odorants, puis la rincer. Cette alternance dans le signal d'entrée va avoir des conséquences importantes sur le comportement des cellules du bulbe olfactif, notamment l'apparition dans les LFP, en réponse à une stimulation odorante, d'une modulation respiratoire (Adrian, 1942). Cette oscillation lente, de forte amplitude varie en phase avec la respiration. Elle reçoit parfois la dénomination d'oscillation théta. Dans le reste de cet ouvrage, nous nous en tiendrons au terme de modulation respiratoire (RM).

Si l'on peut parfois l'enregistrer chez l'animal anesthésié en l'absence d'odeur, le déclenchement de la stimulation odorante s'accompagne soit de l'apparition soit de l'accroissement puissant de l'amplitude de cette RM. C'est un phénomène très robuste qui se retrouve dans tous les enregistrements extra-cellulaires bulbaires (Adrian, 1942; Freeman, 1975; Freeman and Skarda, 1985; Buonviso et al., 2003). Les mécanismes de la modulation respiratoire restent inconnus, mais une hypothèse est qu'elle reflèterait deux composantes, l'une périphérique, l'autre centrale. La composante périphérique serait liée à l'alternance du flux et du reflux des molécules odorantes dans la cavité nasale entraînées par l'alternance de l'inspiration et de l'expiration.

La modulation du niveau d'excitation des OR se retrouve au niveau de la couche glomérulaire. On peut la visualiser en utilisant une méthode d'imagerie optique à haute résolution temporelle combinée à des colorants sensibles aux variations de potentiel (Spors and Grinvald, 2002; Spors et al., 2006). Alors que les méthodes par autoradiographie ne fournissaient que des images statiques de l'activité glomérulaire, cette méthode met en évidence son aspect dynamique. Tout d'abord donc, l'activité au niveau d'un glomérule se développe avec une cinétique particulière, qui est différente d'une odeur à l'autre pour un même glomérule et d'un glomérule à l'autre pour une même odeur. Cette cinétique évolue sur deux échelles de temps imbriquées, l'une rapide entre 100 et 200 ms, l'autre plus lente et corrélée au cycle respiratoire (voir figure 1.20). Autre résultat important : il n'y a que très peu de corrélation entre l'amplitude de la réponse glomérulaire et le décalage temporel de l'activation du glomérule, autrement dit la cinétique d'activation d'un glomérule n'est pas un reflet de l'intensité de la stimulation odorante sur ce glomérule. L'auteur propose que la cinétique rapide permet la représentation rapide de scènes olfactives simples tandis que la cinétique lente permet la représentation de scènes plus complexe et par exemple la discrimination fine entre des odeurs proches. Cette idée que les phénomènes dynamiques ne se bornent pas seulement à créer des représentations de

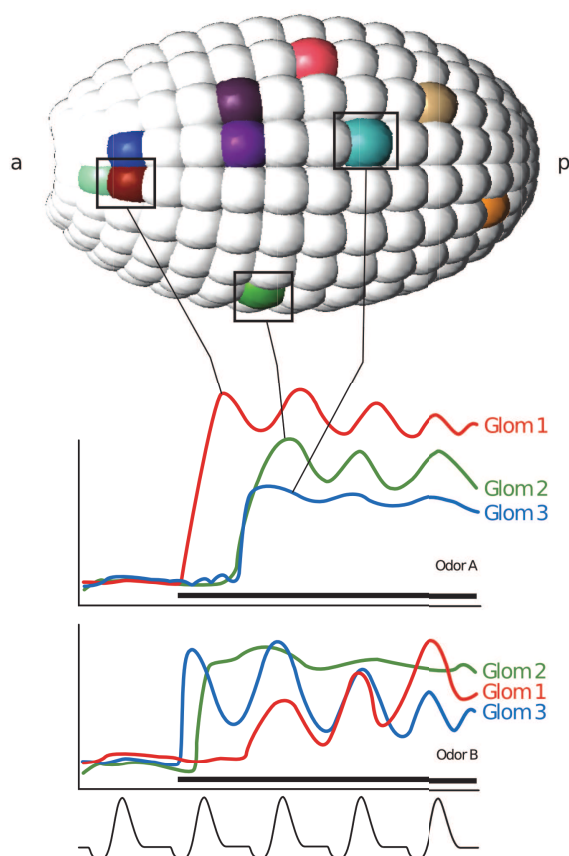


FIG. 1.20: Dynamique d'activation des glomérules par la stimulation odorante, en lien avec la dynamique respiratoire.

Haut : Représentation schématique de la couche glomérulaire du bulbe olfactif, a : antérieur, p : postérieur.

Milieu : Représentation de la dynamique d'activation de trois glomérules en réponse à une stimulation (indiquée par la barre horizontale) par deux odeurs différentes A et B. L'axe des ordonnées indique le niveau d'activation du glomérule, en unité arbitraire.

Bas : Cycle respiratoire, la déflexion négative correspond à l'inspiration, la déflexion positive correspond à l'expiration.

Adapté librement d'après Spors et al. 2006

l'information olfactive mais également à affiner ces représentations pour en améliorer la qualité sera développée plus tard (cf. section 1.5.5).

La composante centrale serait liée à la projection vers le bulbe d'une information en provenance des centres de contrôle de la respiration, situés dans le tronc cérébral. La double composante de la modulation respiratoire explique sa robustesse. On peut même parler d'une triple composante puisqu'il a été montré récemment que la composante pé-

riphérique ne serait pas seulement due à la modulation du contact entre odeurs et récepteurs olfactifs mais également à la réponse mécanique des cils des ORN face au flux d'air (Grosmaître et al., 2007).

Pour une revue sur les phénomènes temporels en lien avec le rythme lent dans le bulbe olfactif : voir Buonviso et al. (2006).

Rythmes lents dans les activités unitaires. La description des phénomènes dynamiques dans le bulbe olfactif ne serait pas complète si on négligeait les activités unitaires des cellules. En effet les oscillations du LFP correspondent à des phénomènes électriques synaptiques se déroulant parmi une population de cellules et ces mêmes phénomènes, à l'échelle unitaire, vont modifier le potentiel de membrane d'une cellule et la conduire à émettre un potentiel d'action ou au contraire l'inhiber. Cependant le comportement de la masse de neurones n'est pas identique au comportement des neurones individuels, puisque le comportement de la masse dépend de la distribution non-uniforme des propriétés dynamiques de chaque neurone et de la connectivité liant de larges populations de neurones entre elles (Freeman, 1972b).

Chez le mammifère le taux de décharge moyen des cellules M/T ne varie pas de façon significative entre les périodes d'activité spontanée et les périodes de stimulation olfactive, cette dernière aura majoritairement pour conséquence une réorganisation temporelle de l'activité des M/T par rapport au cycle respiratoire (Macrides and Chorover, 1972; Onoda and Mori, 1980). Plusieurs tentatives ont été faites de caractériser les réponses des cellules M/T en fonction de l'organisation temporelle de leur décharge par rapport à un autre signal. Kauer décrit plusieurs organisations temporelles de la décharge des cellules bulbaires chez la grenouille, par rapport à l'électro-olfactogramme (EOG), c'est à dire par rapport à la phase d'amplitude du signal afférent (Døving, 1964; Kauer, 1974; Kauer and Shepherd, 1977), d'autres utilisent la même méthode chez le mammifère (Onoda and Mori, 1980). Il existe d'autres méthodes de classification, basées sur le décours temporel du stimulus (Meredith, 1986) ou sa concentration (Døving, 1987) ou déterminées par rapport à la respiration (Pager, 1985; Ravel et al., 1987). La classification utilisée dans nos travaux est celle proposée par Chaput et collaborateurs Chaput et al. (1992), basée sur la modulation respiratoire du taux de décharge des cellules par rapport aux phases du cycle respiratoire. Parmi les types d'activités les plus caractéristiques, on trouve le type :

- a) *non-synchronisé* : la décharge des cellules est uniforme pendant tout le cycle ;
- b) *synchronisé-exciteur* : la fréquence de décharge des cellules présente une augmentation significative sur une phase particulière du cycle respiratoire, généralement à la transition entre inspiration et expiration ;

c) *synchronisé-inhibiteur* : la fréquence de décharge des cellules présente une diminution significative sur une phase particulière du cycle respiratoire, généralement à la transition entre inspiration et excitation ;

d) *synchronisé-complexe* : la fréquence de décharge des cellules présente des augmentations ou diminutions significatives sur plusieurs phases du cycle respiratoire.

En l'absence de stimulation olfactive, le motif de décharge des M/T est globalement désorganisé avec une majorité de patrons *non-synchronisés* et toutefois quelques patrons de type *synchronisé-complexe*. L'arrivée d'une stimulation olfactive déclenche une réorganisation temporelle du train de décharge des M/T avec l'apparition des patrons *synchronisé-excitateur* et *synchronisé-inhibiteur* ainsi que l'augmentation significative du nombre de patrons *synchronisé-complexe*, en proportions variables selon la cellule et l'odeur (Chaput et al., 1992). Chez le rat trachéotomisé, Sobel et Tank étudient la relation entre la modulation respiratoire des activités unitaires et l'organisation temporelle des potentiels d'action en découplant le flux d'air naturel (flux trachéal) du flux d'air à travers la cavité nasale (flux nasal) (Sobel and Tank, 1993). Lorsque le flux nasal est reproduit avec la même fréquence que le flux trachéal, mais en introduisant un déphasage entre les deux, la modulation respiratoire des décharges unitaires reste phasée sur le flux nasal. Lorsque le flux nasal est reproduit à des fréquences différentes de celle de la respiration naturelle, encore une fois la modulation respiratoire de l'activité unitaire maintient la même organisation temporelle relativement à la phase du flux nasal. Dans leur expérience, l'abolition du flux nasal abolit également l'organisation temporelle de la décharge. Le principal résultat de cette expérience est que la modulation respiratoire semble totalement indépendante de la composante centrale, et que l'activité unitaire est en grande partie synchronisée par rapport à la RM, et donc par rapport au signal afférent. A l'opposé de cela, on trouve des éléments expérimentaux soulignant le rôle de la composante centrale (Pager, 1981; Ravel et al., 1987; Ravel and Pager, 1990). Dans ces études, l'animal est trachéotomisé, et les auteurs enregistrent l'activité spontanée des cellules bulbaires en contrôle ou en absence de flux nasal. Dans cette dernière condition, un nombre significatif de neurones continue à présenter une organisation temporelle calée sur la durée du cycle respiratoire. Pour concilier ces deux résultats, on peut admettre que les deux composantes périphérique et centrale existent. L'importance relative des deux composantes pourrait varier en fonction de l'état de vigilance de l'animal, du processus comportemental dans lequel il est engagé et de la valence de l'odeur. Toutefois ces études sont basées sur des méthodes d'enregistrement extracellulaire qui ne fournissent qu'une vision partielle de l'activité unitaire, et ne permettent pas de décrire les répercussions de cette modulation sur le fonctionnement des cellules.

Des données complémentaires peuvent être obtenues par les techniques d'enregistrement intracellulaire. Celles-ci peuvent être réalisées in-vivo sur l'animal anesthésié, ou sur l'animal vigile contraint, mais dû aux difficultés techniques inhérentes à ces préparations, la plupart des études intracellulaires ont été réalisées in-vitro, sur tranches de bulbe. L'inconvénient de cette préparation est que le réseau cellulaire est alors très incomplet et donc la part de l'activité cellulaire qui est dépendante du fonctionnement du réseau sera déformée. Un autre inconvénient d'une telle préparation est que les cellules devront être stimulées électriquement, soit directement soit au niveau de la couche des nerfs, ce qui recrée une situation très éloignée de la stimulation écologique chez l'animal entier. Les interprétations des résultats obtenus avec ce modèle devront tenir compte de ces contraintes. Lorsque la membrane d'un neurone se dépolarise et que sa valeur de potentiel dépasse un certain seuil, le neurone émet un potentiel d'action. Toutefois la valeur du potentiel de membrane n'augmente pas nécessairement de façon linéaire entre le potentiel de repos et le potentiel seuil et peut varier suivant un décours oscillant ; on parle alors d'oscillations sous-liminales du potentiel de membrane. Deux questions se posent alors, d'une part sur l'origine de ces oscillations, d'autre part sur leur rôle.

L'origine des oscillations sous-liminales lentes peut-être soit liée aux propriétés intrinsèques de la membrane du neurone soit aux propriétés du réseau, voire aux deux. Les limitations de la préparation permettent difficilement de répondre à cette question, cependant les évidences s'accumulent en faveur d'oscillations intrinsèques, liées aux propriétés de la membrane des M/T (Balu et al., 2004) : les oscillations enregistrées dans une cellule en réponse à la stimulation des nerfs afférents ne seront pas abolies par l'ajout dans la préparation d'agents pharmacologiques bloquant la transmission glutamatergique (NBQX, antagoniste AMPA et D-APV, antagoniste NMDA). Le neurone pharmacologiquement isolé de l'entrée excitatrice continue à osciller grâce aux propriétés intrinsèques de sa membrane. Plusieurs agents pharmacologiques ont été testés pour déterminer la nature du ou des courants responsables de ces oscillations : tétrodotoxine (TTX, bloqueur à large spectre des canaux sodiques voltage dépendants), tétra-éthyl ammonium (TEA, bloqueur des canaux potassiques voltage-dépendants), suppression du calcium dans le milieu extracellulaire. Seule la TTX montre un effet significatif, abolissant complètement les oscillations sous-liminales (Balu et al., 2004) et suggérant donc que les oscillations lentes du potentiel de membrane sont dues à un ou plusieurs courants sodiques. Cependant certains courants potassiques transitoires semblent nécessaires pour stabiliser ces oscillations et augmenter la cohérence temporelle entre oscillations et potentiels d'action (Balu et al., 2004).

D'un point de vue fonctionnel, un rôle possible pour ces oscillations sous-liminales

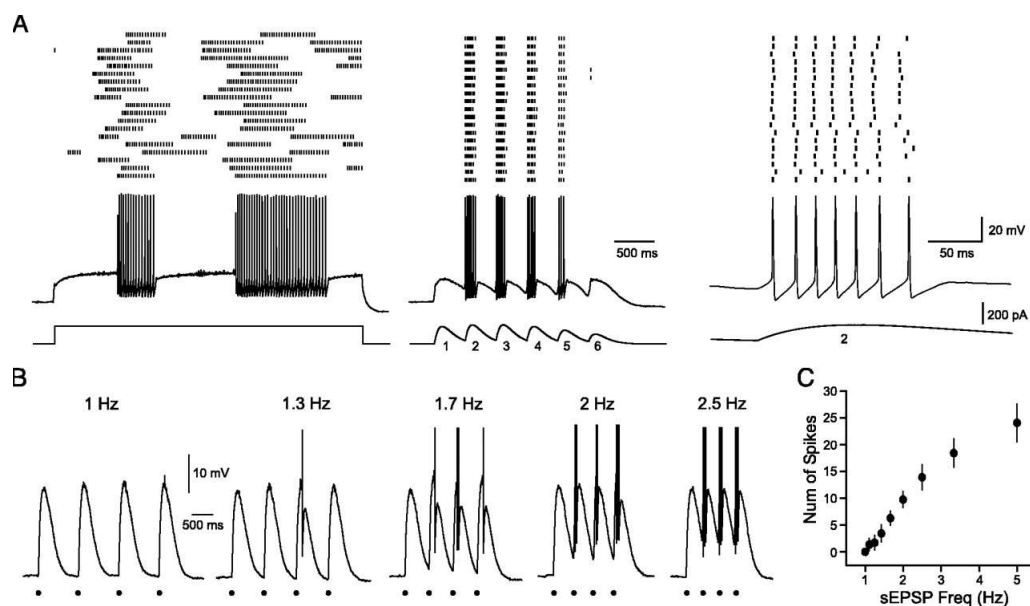


FIG. 1.21: Précision temporelle des décharges de potentiels d'action des cellules mitrales en réponse à un stimulus phasique.

A : Activité en bouffées en réponse à un créneau dépolarisant (gauche) ou une séquence de 6 EPSP simulés (EPSPs) à 2,5 Hz (milieu). Haut : raster sur plusieurs essais ; milieu : tracé brut d'un essai ; bas : courant injecté. À droite : agrandissement du tracé réponse au 2^{ème} EPSPs. Dans cet exemple, la variabilité du 1^{er} AP est réduite à 1,18 ms par le stimulus phasique, contre 258 ms avec le créneau.

B : Réponses à plusieurs quadruplets d'EPSPs uniformes délivrées à plusieurs fréquences différentes. Une séquence de fréquence supérieure à 1 Hz évoque une décharge de potentiels d'action (tronqués), augmentant avec la fréquence des EPSPs.

C : Tracé récapitulatif de la relation entre la fréquence des EPSPs et le nombre total de AP évoqués par les quadruplets (n=5 cellules mitrales).

Source : Balu et al. 2004

lente serait l'organisation temporelle de la décharge des potentiels d'action des cellules M/T, par analogie avec la modulation respiratoire de l'activité multi-unitaire (Chaput et al., 1992). En réponse à un courant dépolarisant tonique, les cellules M/T déchargent par bouffées selon une organisation extrêmement variable, tant au niveau du temps de latence entre le début d'injection du courant et la première bouffée de potentiels d'action qu'au niveau du temps de latence entre deux bouffées successives, ainsi que dans le nombre de potentiels d'action dans une bouffée (Balu et al., 2004). L'interruption brève et régulière du courant dépolarisant diminue significativement la variabilité dans l'organisation temporelle de la décharge, et cet effet est encore accentué si le courant dépolarisant est injecté sous une forme mimant une suite d'EPSP (courant post-synaptique excitateur)

distribués dans une gamme de fréquences proches du rythme respiratoire (1,3 – 5 Hz), voir figure 1.21. Les auteurs concluent qu'un signal excitateur phasique combiné aux propriétés intrinsèques des cellules M/T permet d'organiser précisément la décharge des potentiels d'action de ces cellules. Ils font également le rapprochement entre la fréquence du signal phasique qu'ils utilisent et la fréquence respiratoire de l'animal, et proposent que les cellules du bulbe olfactif soient prédisposées à recevoir une entrée synaptique rythmée par la respiration.

L'enregistrement intracellulaire in-vivo permet d'étudier la relation entre rythme respiratoire et activité unitaire (Cang and Isaacson, 2003; Margrie and Schaefer, 2003; Schaefer et al., 2006). Ces études décrivent des oscillations sous-liminaires du potentiel de membrane, en lien direct avec le rythme respiratoire. Ces oscillations se distinguent de celles décrites dans le paragraphe précédent en ce qu'elles sont abolies par les agents bloqueurs de la transmission synaptique glutamatergique (NBQX, antagoniste des canaux AMPA et D-APV, antagoniste des canaux NMDA) (Margrie and Schaefer, 2003) et sont donc dépendantes des connexions avec le réseau. Le lien avec la respiration est établi d'une part par la cohérence temporelle entre ces oscillations et le rythme respiratoire et d'autre part par le fait que ces oscillations sont abolies par l'occlusion de la narine de l'animal (Margrie and Schaefer, 2003). En réponse à une stimulation, ces neurones vont émettre des bouffées de potentiels d'action, préférentiellement sur la crête de ces oscillations. Les auteurs ont voulu analyser l'influence de ces oscillations sous-liminaires sur l'organisation temporelle de la décharge des cellules M/T (Margrie and Schaefer, 2003) en manipulant artificiellement le niveau d'activité de la cellule enregistrée en injectant un courant via la pipette de patch. Ils montrent une forte corrélation entre l'intensité du courant injecté et le nombre de potentiels d'action dans la bouffée, ainsi que dans le temps de latence entre l'injection du courant et le premier potentiel d'action de la bouffée. Ils prétendent que l'intensité du courant injecté peut être assimilée à l'intensité de l'activation glomérulaire par une stimulation olfactive et qu'en conséquence l'intensité de cette activation va être représentée par le nombre de AP dans la bouffée et par la latence du premier AP. Dans ce cas cette latence ne pouvant être mesurée à partir d'une référence temporelle précise, elle sera exprimée en phase du premier AP par rapport à l'oscillation du potentiel de membrane. Simulant le réseau bulbaire à l'aide d'un modèle, les auteurs montrent que la phase du premier potentiel d'action permet de prédire l'intensité de la stimulation avec une fiabilité significativement meilleure que l'utilisation du nombre de potentiel d'action ou le motif spatial d'activation glomérulaire. En continuant leurs travaux sur la modélisation (Schaefer et al., 2006), combinée avec des expériences in-vivo et in-vitro, les auteurs montrent de plus que l'oscillation lente du potentiel de membrane permet d'accroître la

précision temporelle des potentiels d'action émis par les cellules : dans une bouffée de AP, la latence entre chaque AP successif est constante, à quelques variations près. Ces variations s'accumulent tout au long de la bouffée, résultant en une perte de précision importante. Cependant, les bouffées de AP seront interrompues lorsque l'oscillation entame sa phase descendante, remettant ainsi à zéro la variabilité accumulée. Selon les auteurs, cette dégradation progressive de la précision temporelle des AP amplifie l'importance du premier potentiel d'action et de la précision de ce dernier, assurée par l'aspect oscillatoire du potentiel de membrane de la cellule.

Même s'il est délicat de comparer les résultats in-vivo aux résultats in-vitro, on ne peut s'empêcher de constater que dans les deux cas les cellules M/T utilisent l'oscillation sous-liminaire lente comme support pour organiser temporellement leur activité, assurer la précision temporelle des décharges, y compris celle du premier AP de la bouffée qui semblerait avoir une importance fonctionnelle particulière. Et au niveau de la population on retrouve cette même cohérence entre la modulation respiratoire et l'organisation temporelle des décharges des cellules M/T, mais aussi de l'ensemble des populations cellulaires du bulbe, dans les couches glomérulaire, EPL, mitrale et granulaire, qui toutes présentent une activité organisée en fonction du déroulement temporel de la respiration (Onoda and Mori, 1980; Buonviso et al., 2003), voir figure 1.19.

Enfin, la similarité, entre la modulation respiratoire des LFP et les oscillations sous-liminaires lentes des potentiels de membrane, notamment en fréquence mais aussi au vu de l'organisation relative des décharges de AP, permet de penser que ces deux oscillations sont liées, soit qu'il s'agisse de deux oscillateurs indépendants convergent vers une même fréquence par résonance, soit qu'elles aient une origine commune. Il est donc très probable que la modulation respiratoire ait un impact sur l'ensemble des phénomènes et mécanismes ayant cours dans le bulbe olfactif, modelant l'activité des cellules et influençant l'organisation temporelle d'autres événements, comme par exemple les rythmes rapides.

1.5.1.2 Les rythmes rapides.

Rythmes rapides dans les potentiels de champ locaux. Curieusement, il est impossible de décrire une fois pour toutes les caractéristiques des oscillations du LFP. En fait, on ne devrait même pas parler du LFP mais des LFP, tant le tableau peut changer radicalement selon les conditions expérimentales. La présence ou l'absence d'oscillations, la fréquence, l'amplitude des oscillations, leur déroulement temporel, tous ces paramètres peuvent varier selon l'espèce animale étudiée, la méthode d'enregistrement employée et l'état de

vigilance de l'animal. Une nomenclature a été établie, permettant de classifier les oscillations sur la base de leur fréquence, ayant pour origine les enregistrements électroencéphalographiques où les différentes fréquences correspondent à des phénomènes caractérisés. Dans un hypnogramme par exemple, chaque stade de sommeil est caractérisé par une bande de fréquence d'oscillations particulière, la fréquence diminuant au fur et à mesure que le sommeil devient profond. Les termes retenus sont les oscillations gamma, rapides, entre 40 et 80 Hz, et les oscillations bêta, plus lentes, entre 10 et 30 Hz. On trouve également dans la littérature de nombreuses références à la bande thêta, inférieure à 10 Hz, mais la justesse de cette nomenclature dans le système olfactif est discutable, puisqu'elle procure l'occasion d'un amalgame entre oscillations lentes du LFP et modulation respiratoire. Les bornes de ces bandes de fréquences peuvent varier selon les auteurs et selon l'espèce étudiée.

L'histoire de l'étude des LFP dans le système olfactif, depuis leur découverte, sera marquée par deux ensembles d'études. Tout d'abord les travaux de Rall et Shepherd, couplés à ceux de Shipley et Powell, qui décrivent les mécanismes de ces oscillations à un niveau cellulaire et détaillent les structures impliquées. Nous entrerons dans le détail de ces mécanismes dans une section ultérieure. Le deuxième groupe de travaux correspond aux études de Walter Freeman, qui fut le premier à s'intéresser à l'aspect fonctionnel de ces oscillations et à proposer une implication de ces oscillations dans la représentation de l'information olfactive. Partant de l'idée formulée par Adrian (1950) que le bulbe olfactif pouvait fonctionner selon un principe de distribution spatiale de l'activité, Freeman a réalisé des enregistrements simultanés en plusieurs points du bulbe chez le lapin vigile, utilisant tout d'abord un «peigne» de 10 électrodes disposées linéairement à intervalle constant, puis une grille de 8x8 électrodes. Le système d'amplification, d'enregistrement, de traitement et de filtrage était conçu pour permettre l'analyse des LFP (ici désignés par le terme EEG, probablement parce qu'ils sont enregistrés en surface) et des potentiels d'action. Les enregistrements obtenus avec le peigne (Freeman, 1975) mettent en évidence une hétérogénéité spatiale dans l'amplitude des oscillations du LFP, mais sans pouvoir rapprocher ces variations des caractéristiques des odeurs utilisées. Freeman constate, de plus, la présence de la modulation respiratoire dans le signal en tous points du bulbe. À partir des enregistrements réalisés ensuite avec la grille de 64 électrodes, Freeman a dressé des cartes de l'amplitude de l'activité LFP dans la bande de fréquence gamma (35-90 Hz), évoquée à la surface du bulbe par la stimulation olfactive (Freeman, 1978). Il constate que les contours de ces cartes d'activité sont toujours variables, mais que les pics d'amplitudes correspondent spatialement aux foyers d'activité obtenus par d'autres équipes en cartographie [¹⁴C]2-DG. Si les variations de ces cartes ne sont pas caractéris-

tiques des odeurs, elles sont en revanche caractéristiques des individus ; pour reprendre la formulation de Freeman, «*ces cartes sont comme une signature : jamais identiques mais toujours reconnaissables*». Chez les animaux en comportement, la valence de l'odeur (par ex. une odeur renforcée dans une tâche comportementale) va modifier les cartes de façon significative, stabilisant leur représentation (Freeman and Schneider, 1982). Pour Freeman, l'information n'est pas contenue dans l'aspect de la carte, mais dans les différences qu'elle présente par rapport à une condition contrôle : activité spontanée en l'absence d'odeur ou stimulation avec une odeur non-renforcée (Viana Di Prisco and Freeman, 1985). Au cours de deux séances différentes avec un même animal, la présentation successive d'une même odeur renforcée va évoquer une carte similaire à chaque fois, dont les contours ont été stabilisés par l'apprentissage. En revanche, si l'animal effectue un nouvel apprentissage, par exemple si l'odeur renforcée est changée, non seulement cette nouvelle odeur évoquera une nouvelle carte, mais de plus la carte correspondant à la première odeur sera modifiée. Ceci suggère que les oscillations des LFP bulbaires voient leur organisation temporelle et spatiale modifiées par un traitement cognitif de l'information olfactive, par exemple l'association entre l'odeur et une récompense et que cette modification intervient à chaque nouvel apprentissage, comme si les LFP rendaient comptes de la plasticité cellulaire.

L'explication avancée (Freeman and Skarda, 1985) est que la plasticité induite par la phase d'apprentissage va conduire à la formation d'une assemblée de neurones : un groupe de cellules formant un réseau cohérent via la facilitation des transmissions synaptiques. Cette assemblée peut refléter une signification particulière attribuée à l'odeur, par exemple sa valence. Lors de la stimulation olfactive, le bulbe sera activé en entrée selon un schéma spatial, déterminé par l'organisation des projections épithélio-bulbaires. Cette activité va ensuite être réorganisée selon un schéma dirigé par l'assemblée de neurones précédemment formée. Freeman poursuit ensuite ses travaux en s'appuyant sur la théorie des systèmes chaotiques (Freeman, 1994; Burke et al., 1998). Pour lui, l'activité des LFP dans le bulbe s'inscrit dans le temps comme une suite d'instantanés contenant de l'information mais sans qu'aucune loi ne dirige le passage d'un instantané à l'autre, ou plus rigoureusement sans qu'un état du système ne soit déterminé par l'état précédent ni ne détermine l'état suivant. Dans cette conception, la modulation respiratoire, introduisant une alternance entre un état d'excitation et un état de repos, pourrait stabiliser et optimiser le fonctionnement du système.

L'idée principale qui se dégage de ces travaux est que l'aspect temporel de l'organisation de l'activité bulbaire est autant, sinon plus, que l'aspect spatial un facteur important dans le mécanisme général de la représentation de l'information olfactive. Accueillies avec circonspection à l'époque de leur publication, ces résultats forment néanmoins un fonde-

ment de la recherche actuelle dans le domaine de l'olfaction, ainsi qu'en témoigne l'intérêt croissant que reçoivent les LFP.

Chez l'insecte, on rapporte des LFP oscillant autour de 20 Hz (cricquet) (Laurent and Davidowitz, 1994; Laurent et al., 1996) ou 30 Hz (abeille) (Stopfer et al., 1997). Ces oscillations sont déclenchées par, et se prolongent pendant toute la durée de, la stimulation odorante. Chez le poisson les fréquences rapportées sont du même ordre de grandeur, entre 20 et 30 Hz selon l'espèce (truite, poisson zèbre, morue) (MacLeod and Lowe, 1976; MacLeod, 1976; Friedrich and Stopfer, 2001) et encore une fois ces oscillations apparaissent en réponse à une stimulation olfactive.

Chez le mammifère, les enregistrements effectués chez plusieurs espèces ont permis de décrire des oscillations du LFP tantôt confinées à une seule bande, comme par exemple dans les enregistrements de Freeman ou Kashiwadani, effectués chez le lapin où la stimulation olfactive évoque des oscillations du LFP dans la bande gamma (Freeman, 1978; Kashiwadani et al., 1999), tantôt présents dans deux bandes distinctes, comme le montrent des enregistrements effectués chez le rat où la stimulation odorante va évoquer des oscillations dans les bandes bêta (10-35 Hz) et gamma (40-80 Hz) (Chabaud et al., 2000; Buonviso et al., 2003; Neville and Haberly, 2003; Ravel et al., 2003; Martin et al., 2004). Les oscillations gamma évoquées par la stimulation olfactive sont intrinsèques au bulbe et leur apparition ne dépend pas des projections centrifuges (Gray and Skinner, 1988a; Neville and Haberly, 2003; Martin et al., 2006). Chez le rat, les épisodes d'oscillations bêta et gamma présentent des différences caractéristiques, outre leur fréquence, notamment leur durée ou leur position dans le cycle respiratoire. Une caractéristique majeure du déroulement temporel des oscillations bêta et gamma chez le rat en réponse à l'odeur est leur alternance : les deux oscillations n'apparaissent jamais conjointement (Buonviso et al., 2003). Le mécanisme de cette alternance n'est pas encore élucidé. On pourrait l'expliquer soit par un système générateur basculant entre deux régimes sous l'influence d'un événement régulateur interne ou externe, soit par l'existence de deux systèmes générateurs distincts, correspondant à des phénomènes dynamiques sous-jacents particuliers et séquentiels ou bien encore un même système générateur mais deux circuits différents. Enfin, le niveau de vigilance a une forte influence sur les oscillations. Les conditions pour lesquelles apparaissent les oscillations rapides ne sont pas les mêmes pour un rat vigile que pour un rat anesthésié. Chez ce dernier, une stimulation olfactive suffit pour évoquer les oscillations bêta et gamma tandis que chez le premier les oscillations gamma sont présentes en l'absence d'odeur et disparaissent transitoirement lors de la stimulation olfactive, l'apparition d'oscillations bêta étant quant à elle assujettie à la connaissance qu'aura le rat

de l'odeur (Ravel et al., 2003; Martin et al., 2004). Chez le lapin engagé dans une tâche comportementale, la présentation d'une odeur renforcée déclenche des modifications de la taille, de l'amplitude et de la forme des foyers d'apparition des oscillations, formant des cartes d'amplitudes reproductibles chez un animal mais très différentes d'un animal à l'autre (Freeman and Schneider, 1982; Viana Di Prisco and Freeman, 1985). En revanche, la présentation d'odeurs non renforcées s'accompagne d'une diminution significative de l'amplitude des oscillations gamma (Gray and Skinner, 1988b).

Rythmes rapides dans les activités unitaires Les enregistrements intracellulaires rapportent que le potentiel de membrane des cellules présente des oscillations sous-liminaire également à des fréquences rapides, dans les cortex (Llinás et al., 1991; Silva et al., 1991) mais aussi dans le bulbe olfactif (Chen and Shepherd, 1997; Desmaisons et al., 1999; Schoppa and Westbrook, 2001; Lagier et al., 2004). Le potentiel de membrane peut varier de façon rythmique, à des fréquences allant de moins de 10 à plus de 50 Hz selon les études, l'une d'entre elles montrant que la fréquence de l'oscillation est corrélée au niveau d'excitation de la cellule : plus la cellule est dépolarisée plus son potentiel de membrane oscillera avec une fréquence élevée (Desmaisons et al., 1999). Ces oscillations semblent être dues, tout comme les oscillations lentes, aux propriétés intrinsèques de la membrane. L'application dans le bain d'agents pharmacologiques bloquant la transmission glutamatergique (kynurénate, antagoniste AMPA et NMDA) et la transmission GABAergique (bicuculline, antagoniste GABA_A) n'abolit pas les oscillations sous-liminaires, tandis que l'application de TTX les supprime. Cependant rien ne permet d'affirmer que les oscillations rapides et les oscillations lentes des potentiels de membrane ont la même origine.

Concernant leur rôle fonctionnel, on peut concevoir intuitivement que les oscillations du potentiel de membrane d'un neurone vont affecter la capacité du neurone à émettre des potentiels d'action : à la crête de l'oscillation le potentiel se rapproche de sa valeur seuil. Cela est appuyé expérimentalement par plusieurs études (Desmaisons et al., 1999; Lagier et al., 2004) montrant que les cellules M/T émettent des bouffées de potentiel d'action en phase avec les oscillations du potentiel de membrane. En conséquence, les oscillations sous-liminaires rapides pourraient également jouer un rôle dans la synchronisation de plusieurs cellules M/T : les oscillations sous-liminaires peuvent être «remises à zéro» sous l'action d'un courant inhibiteur ou d'un IPSP (potentiel post-synaptique inhibiteur) (Desmaisons et al., 1999), c'est à dire que l'arrivée d'un IPSP sur la cellule, peu importe la phase de l'oscillation de son potentiel de membrane, va entraîner une hyperpolarisation de la membrane. Suite à cette hyperpolarisation, le potentiel de membrane recommencera à osciller mais en démarrant sur un nouveau cycle. L'implication fonctionnelle de ce

mécanisme est vaste, car si dans une population chaque cellule oscille indépendamment, l'organisation temporelle des décharges paraîtra aléatoire au niveau populationnel même si elle est très organisée au niveau individuel, en revanche si plusieurs de ces cellules reçoivent un signal inhibiteur commun, elles vont alors décharger de manière synchronisée. Le bulbe olfactif étant caractérisé par un réseau important d'interneurones inhibiteurs et par un phénomène d'inhibition latérale des deutoneurones, les propriétés de ses cellules tendent vers un signal très organisé dans le temps, et cohérent au niveau populationnel, permettant notamment la formation d'assemblées de neurones synchronisés.

L'activité du réseau bulbaire est marquée par des oscillations rapides des LFP, dans des bandes de fréquence communes avec certains aspects de l'activité unitaire. On pourrait penser que les oscillations des LFP, de façon similaire à la modulation respiratoire, vont permettre l'organisation temporelle des activités unitaires. Cependant, les oscillations sous-liminaire des cellules M/T sont le résultats de propriétés intrinsèques des membranes, en conséquence la relation entre rythmes rapides unitaires et rythmes rapides des LFP, et les implications fonctionnelles de l'un sur l'autre, sont loin d'être évidents. Avant de pouvoir proposer un rôle fonctionnel pour les oscillations rapides des LFP, il est nécessaire dans un premier temps d'aborder le ou les mécanismes générateurs de ces oscillations.

1.5.2 Mécanismes générateurs des rythmes rapides.

LA PREMIÈRE EXPLICATION THÉORIQUE de la nature des LFP a été proposée par Rall et Shepherd en 1968 Rall and Shepherd (1968), sur la base d'enregistrements extracellulaires *in vivo* dans le bulbe olfactif chez le jeune lapin anesthésié. Les axones des cellules M/T sont stimulés antidromiquement par des chocs électriques. L'électrode d'enregistrement est descendue petit à petit dans le bulbe olfactif selon un trajet perpendiculaire aux couches. A chaque étape de la descente on enregistre le potentiel évoqué par la stimulation électrique, c'est à dire les boucles de courants extracellulaires générées par les cellules mitrales suite à la stimulation de leur axone. Les tracés les plus représentatifs des potentiels de champ évoqués dans chaque couche sont présentés dans la figure 1.22. Pendant les deux premières millisecondes, les signaux possèdent le même déroulement temporel dans toutes les couches et sont légèrement déphasés. Ce décalage de phase représente le temps de conduction du courant entre chaque couche. Cette étape est divisée par les auteurs en deux époques, I et II, si le courant est positif dans une couche à une époque, il

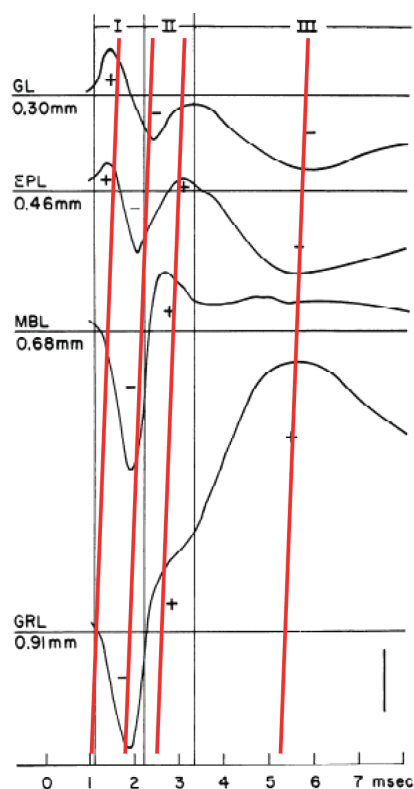


FIG. 1.22: Tracés représentatifs des potentiels de champs enregistrés dans toutes les couches du bulbe olfactif en réponse à une stimulation antidromique.

Les lignes rouges indiquent la propagation des potentiels de champs à travers les couches, correspondant aux courants extracellulaires générés par les cellules mitrales en réponse à la stimulation. Dans les époques I et II, le déroulement temporel des potentiels de champs se retrouve à l'identique dans toutes les couches. À partir de l'époque III les potentiels de champs entre les couches se modifient radicalement, indiquant l'entrée en jeu d'un nouvel acteur cellulaire : les cellules granulaires.

D'après : Rall and Shepherd 1968

sera négatif dans la même couche à l'époque suivante. Les époques I et II correspondent à l'activité de la cellule mitrale seule : tout courant entrant ou sortant est suivi par un courant sortant ou entrant. La deuxième étape, dénommée époque III, est plus longue, 4 ms, et le déroulement du signal se modifie radicalement à partir de la zone EPL. Les auteurs expliquent cette cassure par l'entrée en jeu d'un nouvel acteur cellulaire, les cellules granulaires. En modélisant la circulation des courants électriques dans le bulbe et en considérant chaque élément cellulaire comme une suite de composants électroniques – résistances, condensateurs... – ils démontrent théoriquement que le déroulement de l'époque III est dû à une excitation synaptique massive dans la couche EPL. Cette zone particulière du bulbe

étant connue pour contenir un réseau dendritique dense, d'origine à la fois mitrale et granulaire, les auteurs formulent l'hypothèse que des synapses excitatrices existent entre ces deux réseaux. De plus, toujours au même niveau, les cellules mitrales sont dépolarisées à la fin de l'époque I et pendant l'époque II (courant positif), ce qui les désigne directement comme responsables de l'excitation. Enfin, des enregistrements intra-cellulaires plus anciens (Rall et al., 1966) ont montré que les cellules mitrales étaient inhibées après stimulation et d'après sa cinétique cette inhibition surviendrait juste à la fin de l'époque III. De là, les auteurs ont conclu que l'excitation des granules par les mitrales induisait en retour l'inhibition des mitrales par les granules et ce faisant ont proposé un rôle fonctionnel à la synapse dendro-dendritique réciproque au moment où son existence était prouvée physiologiquement (Rall et al., 1966; Price and Powell, 1970c; Shepherd, 1971). Ainsi, les fluctuations dans les potentiels de champ sont la conséquence du fonctionnement de la synapse dendro-dendritique entre cellules mitrales et granulaires. Si cette interaction se répète plusieurs fois, les fluctuations du potentiel de champs vont se répéter pour prendre une forme oscillatoire : lorsque les MC sont excitées par les axones des ORN elles vont exciter les GC et recevoir une inhibition en retour. Les MC inhibées ne vont plus activer les GC et celles-ci ne vont alors plus inhiber les MC. Si l'excitation en entrée est toujours présente, les MC vont alors à nouveau être actives, et ainsi de suite. La validité de ce mécanisme sera ensuite démontrée par nombre de travaux (Freeman, 1972a, 1975; Mori et al., 1977; Freeman, 1978; Freeman and Schneider, 1982; Isaacson and Strowbridge, 1998).

Par la suite, quelques travaux ont abouti à une modification subtile de l'interprétation de ce mécanisme : plutôt qu'une oscillation dont la fréquence reflète la cinétique de l'alternance entre des courants synaptiques excitateurs et des courants synaptiques inhibiteurs, les oscillations des LFP pourraient être une conséquence des propriétés intrinsèques de la membrane des cellules M/T. Dans la population neuronale du bulbe, les cellules M/T sont intrinsèquement des oscillateurs (cf. paragraphe 1.5.1.2, page 54), et la genèse périodique de courants synaptiques inhibiteurs permettrait la synchronisation de chacun de ces oscillateurs générant ainsi une oscillation à grande échelle (oscillations des LFP). Dans ce modèle, il n'est pas nécessaire que les courants inhibiteurs soient générés à la fréquence de l'oscillation, on parlera alors plutôt d'un bruit inhibiteur générant une synchronisation stochastique (Galán et al., 2006). En revanche, l'efficacité de la synchronisation sera directement dépendante du niveau de corrélation entre les courants inhibiteurs : plus les cellules M/T reçoivent un bruit inhibiteur corrélé et mieux elles seront synchronisées entre elles.

Qu'elle soit stochastique ou non, la composante inhibitrice semble être la clef du sys-

tème de génération des oscillations rapides des LFP. Expérimentalement, cela a été prouvé par plusieurs méthodes. Dans le corps pédonculé de l'abeille, les oscillations rapides des LFP sont abolies par l'injection de picrotoxine, un antagoniste des récepteurs GABAergiques, qui reste sans effet sur le taux de décharge des neurones de projection ou sur leur spécificité aux odeurs (Stopfer et al., 1997). L'effet de la picrotoxine sur le comportement de l'insecte a déjà été mentionné plus tôt (section 1.5). La modification de l'expression de la sous-unité $\beta 3$ du récepteur GABAergique, uniquement exprimée dans le bulbe olfactif par les cellules granulaires, modifie les caractéristiques des oscillations des LFP, chez la souris (Nusser et al., 2001). Enfin, la stimulation tétanisante des glomérules entraîne une augmentation de l'activité inhibitrice des cellules granulaires et cela résulte en une augmentation de l'amplitude des oscillations des LFP (Friedman and Strowbridge, 2003).

L'ensemble de ces travaux sur les mécanismes générateurs des oscillations des LFP ne porte que sur les oscillations dans la bande gamma, soit que les autres oscillations, notamment celles de la bande bêta, n'ont pas été enregistrées (conditions expérimentales particulières, type d'anesthésie, filtrage du signal...) soit qu'elles aient été volontairement écartées. Le résultat en est que les données sur les oscillations bêta dans la littérature sont très réduites.

Une des études les plus complètes sur ces oscillations a été réalisée par Neville et Haberly et tente de répondre à la question de l'origine de ces rythmes (Neville and Haberly, 2003). Les auteurs procèdent en trois étapes, basées sur des enregistrements extracellulaires sur rats anesthésiés et trachéotomisés, la stimulation odorante consistant en une série d'inspirations artificielles prolongées (1,5 s). Ils constatent que la stimulation odorante peut évoquer des oscillations des LFP dans les bandes bêta et gamma, mais à la différence des résultats de Buonviso et al. (2003) les oscillations dans l'une ou l'autre bande ne sont pas toujours concomitantes et sont directement liées à la concentration de l'odeur : une même odeur délivrée à des concentrations fortes, faibles ou intermédiaires vont, dans l'ordre, évoquer des oscillations dans la bande gamma seulement, dans la bande bêta seulement et enfin dans les deux bandes. Dans le cas où les oscillations sont évoquées dans les deux bandes, elles apparaissent l'une après l'autre, le gamma précédant le bêta. Plutôt qu'une corrélation linéaire entre l'intensité de la stimulation et la fréquence des oscillations, les oscillations basculent donc d'un régime à l'autre et les auteurs démontrent en outre que les oscillations bêta ne sont pas une résonance harmonique des oscillations gamma. Dans la deuxième étape de leur étude, Neville et Haberly utilisent des enregistrements simultanés multi-sites pour analyser les densités de sources de courant (CSD, current source density). Ils en tirent trois constatations :

- a) le dipôle correspondant aux oscillations gamma et bêta se ressemblent (dipôle entre la couche EPL et la couche granulaire) et ressemblent au dipôle correspondant aux courants synaptiques des cellules granulaires, obtenu par stimulation électrique du LOT ;
- b) le décalage temporel du dipôle correspondant aux oscillations gamma suit le décalage temporel de l'activité synaptique évoquée dans les cellules granulaires par les cellules mitrales, telle qu'obtenue lors de la stimulation électrique des fibres afférentes au bulbe ;
- c) le décalage temporel du dipôle correspondant aux oscillations dans la bande bêta suit le décalage temporel des retours centrifuges sur les cellules granulaires, tels qu'enregistrés lors de la stimulation électrique du cortex piriforme antérieur.

Enfin, dans une troisième étape, s'inspirant des travaux de Gray et Skinner, ils isolent le bulbe olfactif, en sectionnant le pédoncule, c'est à dire la zone reliant le bulbe au reste de l'encéphale. En situation contrôle, on enregistre des oscillations dans les bandes gamma et bêta dans le bulbe olfactif et dans le cortex piriforme. En situation de bulbe isolé, les oscillations gamma sont conservées tandis que les oscillations bêta sont entièrement abolies, dans le bulbe olfactif, et les deux oscillations sont complètement abolies dans le cortex piriforme (Neville and Haberly, 2003; Martin et al., 2006). En conclusion, après avoir montré que les oscillations bêta et gamma sont deux régimes de fonctionnement différents du réseau, les auteurs montrent que les deux régimes oscillatoires s'articulent autour des courants inhibiteurs générés par les cellules granulaires, la communication entre le bulbe et le cortex piriforme n'étant dans un cas pas nécessaire (régime gamma) et dans l'autre cas indispensable (régime bêta). Les auteurs proposent pour interpréter leurs résultats qu'une forte activité dans les cellules M/T entraîne une forte inhibition en retour par les cellules granulaires, forçant la synchronisation des M/T et l'apparition d'oscillations des LFP dans la bande gamma. À l'opposé, l'activité modérée des M/T n'entraîne que peu d'inhibition granulaire et donc une entrée forte dans les cellules pyramidales. Celles-ci vont alors activer les cellules granulaires qui vont inhiber les cellules M/T.

La conclusion de ces résultats est que le mécanisme générateur est le même pour les deux régimes mais le circuit est différent. Dans les deux régimes, les oscillations des LFP sont générées par l'injection dans le réseau d'un courant inhibiteur en provenance des cellules granulaires. Cependant dans un cas le circuit impliqué dans la genèse de ces oscillations est restreint au bulbe olfactif et concerne donc vraisemblablement les cellules M/T et les cellules granulaires (régime gamma) et dans l'autre cas le circuit impliqué s'étend du bulbe au cortex piriforme et met en jeu les cellules M/T, les cellules pyramidales et les cellules granulaires (régime bêta). La différence de fréquence entre les deux

régimes pourrait trouver très simplement son origine dans l'augmentation de la distance que doit parcourir l'information lorsque le circuit s'étend au cortex piriforme.

D'après l'ensemble de ces travaux, les oscillations rapides dans les LFP ont pour origine l'interaction entre les courants synaptiques excitateurs puis inhibiteurs qui se déroule au niveau de la synapse dendro-dendritique entre les cellules M/T et les cellules granulaires. Cette synapse est mise en branle dès que le réseau est activé par un signal afférent, c'est à dire lorsqu'une information olfactive est perçue dans la cavité nasale, mais le circuit de neurones dans lequel cette synapse est active est variable selon l'intensité du signal afférent et va périodiquement inclure les projections du cortex piriforme. Ce changement de circuit entraîne un changement de régime oscillatoire. En conclusion, les oscillations des LFP sont une partie intégrante du fonctionnement du réseau olfactif et nous allons maintenant explorer les quelques rares pistes existant sur le, ou les rôles fonctionnels potentiels de ces oscillations.

1.5.3 Synchronisations, oscillations et assemblées.

DANS LA LITTÉRATURE, les liens entre oscillations des LFP, oscillations sous-liminales des potentiels de membrane, organisation temporelle de l'activité unitaire et synchronisation des cellules sont loins d'être clairs. De la lecture de certaines études ressort parfois l'impression que les auteurs font un amalgame entre ces différentes catégories de phénomènes dynamiques, le plus courant étant que «*les oscillations des LFP reflètent la synchronisation des cellules*», sans plus de précision sur ce qu'est cette synchronisation et sur le lien entre les deux phénomènes. Or, il n'existe pas à l'heure actuelle de preuve expérimentale autorisant une telle interprétation. Cette confusion provient vraisemblablement du cadre théorique de la représentation de l'information par assemblées de neurones synchronisés, dans lequel la synchronisation des cellules et les oscillations des LFP jouent un rôle complémentaire, ainsi que nous allons le décrire.

Le cerveau est un organe essentiellement destiné à traiter de l'information. Son unité de base étant le neurone, la question est : quelle est la quantité d'information représentée par un neurone ? Si l'on associe une unité d'information – un symbole – à un neurone, on a alors une représentation unitaire de l'information : l'activité de ce neurone et de ce neurone seul permet la représentation du symbole associé. L'avantage d'une telle représentation, dite codage hiérarchique, est sa simplicité, un neurone = un symbole, en revanche les

désavantages sont le manque de robustesse – la perte d’un neurone entraîne la disparition du symbole associé – et la saturation rapide du système – le nombre total de symboles accessibles étant limité par le nombre de neurones présents. Pour un système vivant, ces défauts sont rédhibitoires. Une autre possibilité de représentation est le codage combinatoire, ou populationnel. Un symbole est associé à un sous-ensemble de la population de neurones, l’activation conjointe des neurones composant ce sous-ensemble permet la représentation du symbole. Les avantages sont d’une part la robustesse, la disparition d’un neurone membre d’un sous-ensemble va altérer la représentation d’un symbole mais n’entraînera pas sa disparition, d’autre part le nombre de possibilités est quasiment infinie, chaque neurone pouvant faire partie d’un grand nombre de sous-assemblées différentes, le nombre de symboles différents pouvant être représentés est exponentiel. Le désavantage est la complexité de la représentation : il faut en aval un système de lecture capable de détecter l’activation conjointe des membres d’un sous-ensemble. La situation se complique encore lorsque plusieurs symboles doivent être représentés en même temps et que certains neurones appartiennent à deux sous-ensembles distincts. Chaque sous-ensemble doit pouvoir se distinguer des autres par un trait saillant, un marqueur. Sur la base des théories de Donald Hebb (1949), le concept d’assemblées de neurones a été proposé et développé pour répondre à ces critères. Une assemblée de neurones est une population de neurones qui se distingue de l’ensemble non par des caractéristiques morphologiques ou physiologiques mais par des caractéristiques temporelles telles que la synchronisation transitoire de leur activité. Un symbole est alors représenté par l’activation simultanée et synchronisée d’une assemblée de neurones, la synchronisation successive et rapprochée de plusieurs assemblées permet la représentation quasi simultanée de plusieurs symboles. (Von der Marlsburg, 1981; Hopfield and Brody, 2001). Cette synchronisation peut-être interne à l’assemblée, c’est à dire que les neurones sont synchronisés entre eux, émettant des potentiels d’action en même temps, mais elle peut aussi être établie par rapport à une référence externe, ou horloge commune à l’ensemble de la structure cérébrale, comme par exemple les oscillations des LFP, (John, 1972; Freeman, 1981; Coopersmith and Leon, 1984). Les structures en aval devront donc se comporter comme des détecteurs de synchronisation. Pour une revue sur le principe et les applications du codage par assemblées de neurones, voir Pouget et al. 2000, ou Freeman and Skarda 1985 pour une revue centrée sur le système olfactif.

En appui à cette théorie, un nombre conséquent d’études dans plusieurs régions de l’encéphale montre l’existence de phénomènes de synchronisation entre cellules et oscillations des LFP, le point commun entre ces études étant qu’à chaque fois ces phénomènes sont basés sur une interaction entre composantes excitatrices et inhibitrices. Pour la syn-

chronisation, cela a été montré par exemple chez le chat et le rat dans le colliculus supérieur (Lund, 1969; Sterling, 1971), chez le primate dans les aires motrices (Sloper, 1971), mais plus encore chez le chat et le primate dans le thalamus (Famiglietti, 1970; Harding, 1971), ces deux dernières études décrivant des synapses dendro-dendritiques réciproques similaires aux synapses du bulbe olfactif. Les oscillations rapides des LFP ont été montrées dans le thalamus, notamment lors de la propagation de l'information visuelle le long de la voie rétino-thalamo-corticale (Neuenschwander et al., 2002) et leur altération accompagne les trémeurs pathologiques (Kane et al., 2009) et la douleur neurologique chronique (Sarnthein and Jeanmonod, 2008). Leur origine réside dans l'interaction entre cellules excitatrices et interneurons inhibiteurs Jones2002Contreras2002. En fait, l'apparition d'oscillations des LFP dues aux interactions excitation/inhibition a été montrée dans une grande majorité de structures corticales telles l'hippocampe (Csicsvari et al., 2003), le cortex auditif (Brosch et al., 2002), le cortex pariétal (Pesaran et al., 2002) le cervelet (Middleton et al., 2008)...

Enfin, la relation entre les oscillations du LFP et les mécanismes fonctionnels de synchronisation a été montrée pour la première fois dans le système visuel. En 1989, Gray et Singer (Gray and Singer, 1989; Gray et al., 1989) montrent que, chez le chat anesthésié, les LFP enregistrés dans le cortex visuel primaire (aires 17 et 18) présentent des oscillations dans la bande gamma en réponse à une stimulation lumineuse. Le cortex visuel est organisé en colonnes de dominance, chaque colonne répondant préférentiellement à des conditions de position dans l'espace et d'orientation du stimulus quand celui-ci est présenté sous la forme d'une barre lumineuse. Les oscillations du LFP montrent les mêmes préférences de position et d'orientation, suggérant que c'est la décharge synchrone des neurones d'une colonne qui génère l'oscillation. Dans le cortex sensorimoteur du primate vigile (Murthy and Fetz, 1996a,b), l'enregistrement couplé dans deux zones à distances variables montre l'apparition d'oscillations du LFP dans la bande gamma pendant l'exécution de tâches d'exploration manuelle. L'apparition d'oscillations synchrones entre les deux zones d'enregistrements suggère que les neurones sont non seulement synchrones entre eux à l'intérieur d'une zone mais qu'ils sont également synchronisés entre les deux zones. Lors de l'exécution de tâches bilatérales, la synchronisation peut être enregistrée entre les deux hémisphères. Ces résultats indiquent que la synchronisation peut s'établir entre des zones distantes afin d'accomplir des tâches précises demandant la coordination d'au moins deux zones de l'encéphale.

Dans le système olfactif également les éléments s'accumulent en faveur de la théorie des assemblées de neurones. En effet, aussi bien chez l'insecte que chez le mammifère, synchronisations et oscillations des LFP sont associées par une origine commune. Chez

l'insecte, les enregistrements intracellulaires des neurones de projection (PN) et des neurones locaux (LN, interneurons inhibiteurs) montrent que le potentiel de membrane des PN oscille de façon cohérente et phasée et que les PN émettent des potentiels d'action synchronisés (Laurent and Davidowitz, 1994). Les PN reçoivent un courant post-synaptique inhibiteur au moment où les LN sont marqués par une forte dépolarisation, les auteurs en concluent donc que ce sont les LN qui inhibent les PN et synchronisent leurs oscillations. Les potentiels d'action dans les PN ne peuvent être émis que pendant une courte fenêtre temporelle, quand la membrane est suffisamment dépolarisée pour atteindre le seuil et avant l'arrivée du PPSI. La synchronisation des potentiels d'action des PN est donc rendue possible par la synchronisation des oscillations du potentiel de membrane de ces cellules. À son tour, cette synchronisation est rendue possible par l'interaction excitatrice/inhibitrice entre PN et LN. L'application d'un antagoniste des récepteurs GABA supprime la synchronisation des PN entre eux (MacLeod and Laurent, 1996). Cependant, les PN continuent à émettre des potentiels d'action. L'inhibition par les LN est donc probablement responsable de la synchronisation des neurones. Dans la même étude, en enregistrant les neurones avec une paire d'électrodes, Laurent montre que lorsque deux neurones répondent à la même stimulation par une excitation, ils émettent des potentiels d'action synchrones et de plus les oscillations sous-liminaire de leurs potentiels de membranes sont synchronisées entre elles et également par rapport aux oscillations des LFP enregistrés dans le corps pédonculé (Laurent and Davidowitz, 1994). Le motif de décharge d'un même PN est caractéristique de l'odeur et reproductible. De la même façon, pour une paire de neurones donnée, l'activité dans l'un, l'autre ou les deux PN est également caractéristique de l'odeur et reproductible. Au niveau de la population, la présentation d'une odeur entraîne invariablement l'activation d'assemblées synchronisées de neurones, spécifiques de l'odeur, mais la décharge de chaque neurone individuel est en revanche probabiliste (Laurent et al., 1996). La séquence exacte des neurones activés par une stimulation odorante n'est donc pas fixe mais, au contraire, varie d'un cycle à l'autre du LFP. Pour les auteurs (Laurent et al., 1996; Wehr and Laurent, 1996), cela indique que l'information olfactive est représentée par une séquence d'activation d'assemblées de neurones distinctes.

Chez le mammifère, les phénomènes de synchronisation ont été montrés en intracellulaire sur tranche de bulbe olfactif de rat, (Desmaisons et al., 1999; Lagier et al., 2004). Cette littérature est déjà décrite en détail dans la section 1.5.1.2, nous rappellerons simplement que les oscillations sous-liminaire rapides des potentiels de membranes sont issues des propriétés intrinsèques des membranes des cellules M/T, et que ces oscillations peuvent être synchronisées par l'action d'un courant inhibiteur, plus précisément les IPSP GABAergiques déclenchés par l'activité des cellules granulaires. In-vivo, Kashiwadani et

al. enregistrent chez le lapin l'activité simultanée de deux neurones bulbaires, en extracellulaire (Kashiwadani et al., 1999). Les deux neurones sont distants de 300 à 500 μm et donc connectés à des glomérules différents. Lorsqu'une stimulation olfactive parvient à activer les deux neurones de la paire, ces deux neurones émettent leurs potentiels d'action de façon synchrone et en phase avec les oscillations gamma (40 Hz) des LFP.

Il existe donc un triptyque de phénomènes dynamiques, synchronisations d'un côté, oscillations des LFP de l'autre, l'inhibition occupant le panneau central. Il existe toutefois quelques exemples de systèmes dans lesquels la synchronisation est obtenue par une composante excitatrice (Whittington et al., 1995), mais ce n'est clairement pas le cas du bulbe olfactif. On retrouve ce triptyque chez plusieurs espèces animales, dans plusieurs modalités sensorielles, dans le système moteur, en fait dans quasiment toutes les structures corticales. Il s'intègre à la théorie du codage par assemblées dynamiques de neurones, puisqu'il en contient les éléments principaux : mécanisme synchronisateur et référence temporelle. Un élément, de taille, manque cependant encore au tableau : le mécanisme de lecture de ces assemblées, dont il est traité dans le paragraphe suivant.

Des données complémentaires sur le codage par assemblées dynamiques peuvent être trouvées dans les revues de Laurent 2002 pour l'insecte et Friedrich and Stopfer 2001 pour le poisson, dans le système olfactif et Singer and Gray 1995 pour le système visuel.

1.5.4 Des assemblées, oui mais après ?

COMME DIT PRÉCÉDEMMENT, le codage par assemblées de neurones présente des avantages certains par rapport à un codage hiérarchique, mais nécessite en aval un système capable de détecter la formation des assemblées. Nous allons voir ici qu'il existe des arguments expérimentaux en faveur de l'existence de ces systèmes.

Chez l'insecte, les cellules de Kenyon (KC) sont les neurones relais du corps pédonculé, structure située en aval du lobe antennaire, et est l'équivalent du cortex piriforme chez le vertébré. Les KC reçoivent d'une part des entrées excitatrices en provenance des PN et d'autres part des entrées inhibitrices en provenance des interneurones de la corne latérale (LHI), une troisième structure du système olfactif de l'insecte, sans équivalent chez le vertébré. L'activité des LHI est synchronisée sur le LFP mais n'est pas dépendante de la stimulation olfactive : à chaque cycle de l'oscillation les LHI vont inhiber les KC, que celles-ci soient actives ou non. Cette organisation du réseau a pour conséquence la

création d'une fenêtre temporelle pendant laquelle les KC peuvent être activées par les PN. Si les PN projetant sur une KC sont trop peu actives, cette dernière sera inhibée par les LHI avant d'avoir atteint le seuil d'émission d'un potentiel d'action. Autrement dit, une KC pourra être activée par les PN si elle reçoit suffisamment de potentiel d'action pendant l'intervalle de temps limité de la fenêtre temporelle (cf. figure 1.23). En résumé, les KC sont des détecteurs de coïncidence, activées par l'émission synchronisée des potentiels d'action de plusieurs PN, c'est à dire la formation transitoire d'une assemblée de neurones (Perez-Orive et al., 2002, 2004).

Le fonctionnement des cellules pyramidales du cortex piriforme en revanche semble bien différent de celui des KC. Ces neurones reçoivent les projections d'un nombre indéterminé de neurones M/T du bulbe olfactif, avec un poids synaptique variable (Franks and Isaacson, 2006) : certaines terminaisons axonales se ramifient grandement avant de contacter la cellule pyramidale, formant un grand nombre de synapses excitatrices, d'autres terminaisons seront très peu ramifiées, formant seulement quelques synapses. En conséquence, les cellules pyramidales recevront globalement un signal afférent fort, en provenance d'un faible nombre de cellules bulbaires. Les mêmes auteurs montrent également que ce signal afférent est capable de déclencher l'émission de potentiels d'action par les cellules pyramidales à condition qu'il soit intégré dans une fenêtre de temps courte, de l'ordre de 10 ms. Cela signifie que dans cette fenêtre temporelle, la cellule pyramidale peut soit intégrer le signal en provenance d'un seul neurone bulbaire actif à plus de 100 Hz, soit intégrer les potentiels d'action coïncidant de plusieurs cellules bulbaires pendant au plus 10 ms. Dans le cadre théorique mentionné plus haut, une assemblée de neurones dont les constituants seraient synchronisés par rapport aux oscillations des LFP, émettraient des potentiels d'action coïncidant selon un rythme correspondant à la fréquence de l'oscillation. Or on enregistre dans le cortex piriforme du rat des oscillations du LFP dans les bandes de fréquence bêta et gamma, directement corrélées au fonctionnement du bulbe olfactif, et les cellules pyramidales déchargent en phase avec le pic du LFP pendant les épisodes d'oscillations gamma (Bressler and Freeman, 1980; Bressler, 1984; Neville and Haberly, 2003; Martin et al., 2006; Litaudon et al., 2008). Cela permet de penser que les neurones pyramidaux du cortex piriforme se comportent en détecteurs de coïncidence.

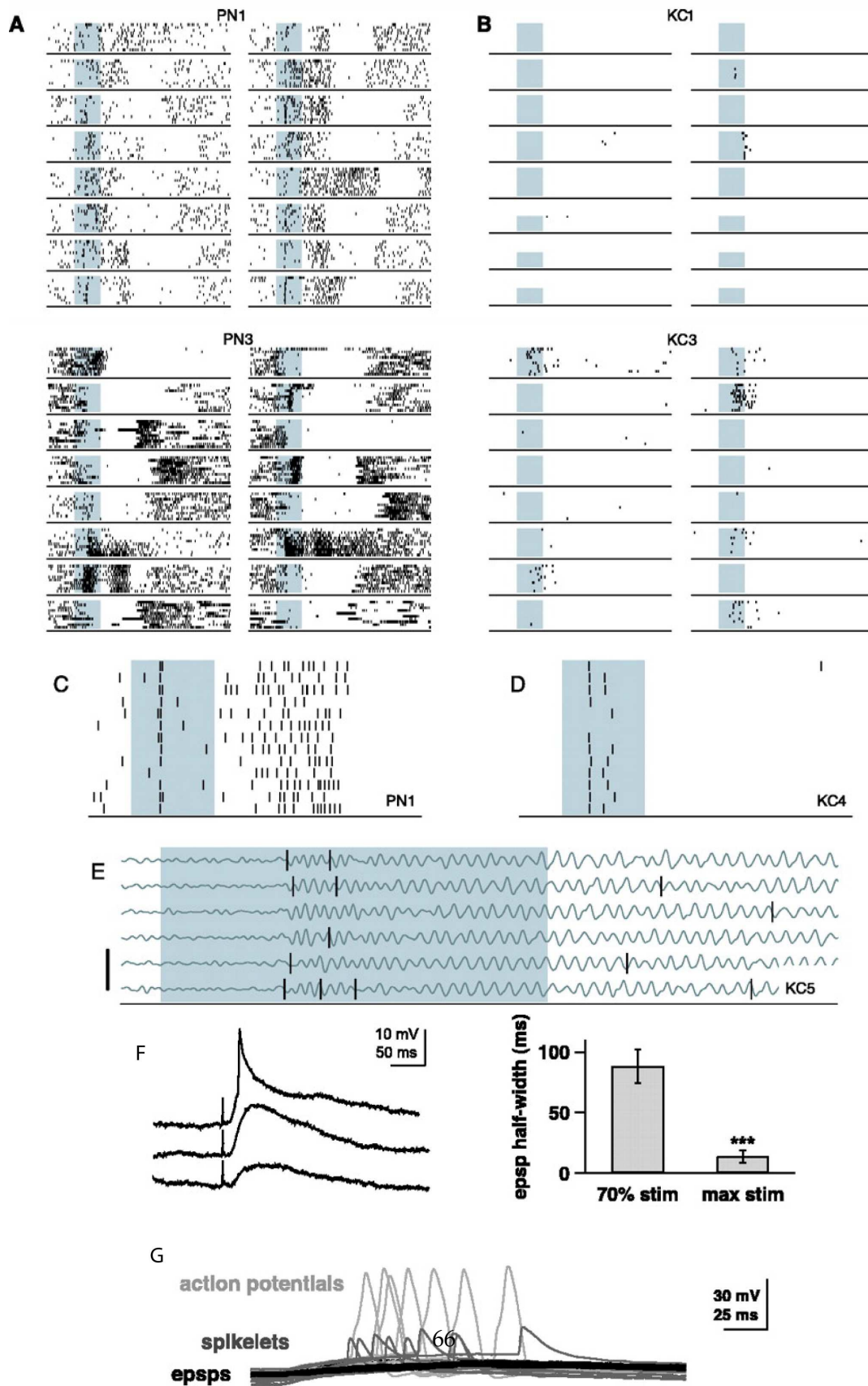


FIG. 1.23: La détection de la synchronisation des neurones de projections par les cellules de Kenyon chez l'insecte, enregistrements in-vivo par tétrodes ; page 66.

Enregistrements, en réponse à une stimulation olfactive, de l'activité des neurones de projection (PN) (A et C) et des cellules de Kenyon (KC) (B, D et E).

A,B : Enregistrements simultanés de 2 PN (A) et enregistrements simultanés de 2 KC (B). La zone grisée correspond à la stimulation (1s), chaque bloc de 16 tracés (raster plots) correspondant à 16 stimulations successives par une odeur différente dans une même cellule, 1 tracé correspond à 10 essais successifs avec la même odeur.

C,D : Agrandissement des rasters d'un PN (C) et d'une KC (D). Noter la différence de comportement de décharge entre les deux types cellulaires ainsi que l'alignement des AP.

E : Superposition de l'activité unitaire d'une KC sur 5 essais avec une même odeur et des LFP concomitants enregistrés dans le corps pédonculé.

F, G : Réponse des KC à une stimulation électrique des PN.

F : À gauche : EPSP des KC enregistrés en intracellulaire, évoqués par la stimulation des PN. Les trois tracés (du bas vers le haut) correspondent à des stimulations d'intensité croissante. La trace du haut montre l'apparition d'un spikelet (ou mini-AP) suggérant un phénomène actif. À droite : comparaison de la demi-vie de l'EPSP par rapport au pourcentage de l'intensité de stimulation nécessaire pour déclencher un AP. À mesure que le potentiel de membrane approche la valeur liminaire, les EPSP ont des temps de montée et de descente de plus en plus brefs.

G : Enregistrements de l'activité de KC maintenues à un potentiel proche de la valeur liminaire, en réponse à des stimulations des PN. La réponse des KC varie entre potentiels d'action, EPSP ou spikelets. Des conductances intrinsèques actives amplifient et resserrent les EPSP à l'approche du seuil de déclenchement des AP.

Source : Perez-Orive et al. 2002

1.5.5 L'évolution de la représentation de l'information dans le temps.

LE PROCESSUS DE PERCEPTION SENSORIELLE N'EST PAS UN PHÉNOMÈNE INSTANTANÉ et s'inscrit forcément dans une certaine durée, généralement estimée à une centaine de millisecondes entre la présentation du stimulus et sa perception (le stimulus est considéré comme perçu lorsque l'animal déclenche une réponse comportementale par rapport à ce stimulus, voir la revue par Luce 1986). Le système olfactif a longtemps été considéré comme une modalité sensorielle lente, pourtant un nombre important d'espèces animales utilisent l'olfaction comme modalité sensorielle principale, ce qui implique que cette modalité est néanmoins suffisamment rapide pour permettre certains comportements indispensables à la survie d'une espèce, par exemple la capacité à détecter l'approche d'un prédateur. Nous avons décrit le principe de codage temporel dans la modalité olfactive,

ou l'importance de l'évolution du signal dans le temps pour assurer sa représentation correcte. La question la plus naturelle qui vient alors à l'esprit est : «mais le codage temporel, ça prend longtemps ?»

Deux études chez le rongeur mesurent le temps nécessaire pour la discrimination entre deux odeurs (Uchida and Mainen, 2003; Abraham et al., 2004). Dans les deux cas, les animaux doivent accomplir une tâche comportementale motivée par une récompense et guidée par des indices olfactifs, l'attribution de la récompense étant conditionnée par la distinction correcte entre deux odeurs. Les conditions du test varient entre des tâches de discrimination simples (deux odeurs différentes) et des tâches de discrimination complexes (mélanges binaires de deux odeurs dans des proportions variables). Les deux études rapportent que le temps nécessaire pour la discrimination simple est inférieur à 200 ms. Dans le cas de la discrimination complexe, les résultats divergent, Uchida et Mainen ne voient pas, ou peu (35 ms) de changement dans le temps de discrimination par rapport à la tâche simple, tandis qu'Abraham et al. constatent une augmentation graduelle du temps de discrimination avec l'augmentation de la complexité de la tâche, pouvant aller jusqu'à une moyenne de 100 ms supplémentaires. Ils attribuent cette divergence de résultat aux conditions de mesure du temps de réaction de l'animal, suggérant que dans l'étude de Uchida et Mainen les souris sacrifient la précision à la rapidité. Dans ces deux études cependant, le rapprochement est fait entre la similarité des odeurs et la similarité des cartes spatiales évoquées à la surface du bulbe et enregistrées en imagerie optique : les odeurs utilisées dans les tâches simples évoquent des cartes d'activation glomérulaires largement différentes tandis que les mélanges binaires utilisés dans les tâches complexes évoquent des cartes d'activation glomérulaires très semblables et largement recouvrantes. On peut en penser que le temps supplémentaire requis pour l'exécution des tâches complexes correspond aux processus nécessaires pour ségréger les deux cartes. Quoiqu'il en soit, le temps minimum nécessaire pour discriminer deux odeurs est du même ordre de grandeur que la durée d'un cycle respiratoire : la discrimination simple ou complexe (chez des animaux entraînés) ne nécessite qu'une seule inspiration. Une étude plus récente se base sur une réaction comportementale beaucoup plus basique : l'augmentation de la fréquence respiratoire en réaction à une odeur nouvelle (Wesson et al., 2008). Ici, les auteurs mesurent le temps écoulé entre la présentation du stimulus, l'activation des glomérules et la réponse comportementale et ils rapportent que la réponse comportementale apparaît avec une latence de 200 ms (dès le deuxième sniff) dont 100 à 150 ms de traitement périphérique, ne laissant que 100 à 50 ms pour le traitement central dans le bulbe et le cortex et l'adaptation du comportement respiratoire. De cette étude on conclut que si l'appareil sensoriel

olfactif est, lui, plus lent que les appareils sensoriels visuels ou auditifs, au niveau central la rapidité de fonctionnement de ces différentes modalités est probablement tout à fait comparable.

Si la durée d'un cycle respiratoire rapide est la durée minimum requise pour l'établissement de la représentation spatio-temporelle de l'information olfactive, doit-on pour autant penser que la fin du cycle respiratoire correspond à la fin de la représentation temporelle ? Cela est peu probable. Après tout, même si nous sommes capable de reconnaître le visage d'un ami d'un seul coup d'œil, il nous faut souvent quelques secondes avant de constater que cet ami s'est fait couper les cheveux, ou qu'il a les traits fatigués. Lorsque nous sentons un verre de liquide, nous identifions tout de suite qu'il s'agit de vin, mais humons plusieurs fois afin de se faire une image plus précise du bouquet, chaque nouvelle inspiration correspondant à un nouvel échantillonnage de l'odeur. Il est donc probable que les mécanismes temporels déclenchés lors de la perception de l'odeur continuent à façonner l'information représentée, aboutissant à une image de plus en plus riche à mesure que les échantillons s'accumulent.

Chez l'insecte, la prolongation d'un stimulus odorant s'accompagne d'une diminution de l'intensité de la réponse des neurones constituant l'assemblée représentant cette odeur. Conjointement, la cohérence temporelle, ou synchronisation, entre ces mêmes neurones augmente. Autrement dit les neurones émettent moins de potentiels d'action mais ils sont beaucoup plus précis par rapport à la phase des oscillations du LFP (Stopfer and Laurent, 1999).

La stimulation olfactive chez le poisson est caractérisée, rappelons le, par l'apparition d'oscillations du LFP entre 20 et 30 Hz et elle s'accompagne de motifs de réorganisation à cinétique lente (Friedrich and Laurent, 2001). Ce terme désigne une fenêtre temporelle de basse fréquence pendant laquelle les neurones vont se joindre à une assemblée synchronisée, ou la quitter, parfois pour en rejoindre une autre. Ces réorganisations lentes des synchronisations vont petit à petit réduire la redondance, c'est à dire le nombre global de cellules impliquées dans une même représentation olfactive et augmenter le pouvoir de discrimination. C'est à dire qu'à mesure que le temps s'écoule les assemblées deviennent plus précises, plus efficaces et plus réduites. Dans les premiers stades de la représentation, les neurones synchronisés forment des clusters très semblables à la répartition spatiale glomérulaire de l'afférence, puis la dynamique du circuit bulbaire brise ces clusters et les représentations se distribuent de façon plus efficace à travers l'espace neuronal. Dans le même ordre d'idée, et toujours chez le poisson, les cellules M/T se divisent en deux populations, celles qui émettent des potentiels d'action synchronisés, ou phasés, sur le LFP et celles qui émettent des potentiels d'action peu ou non synchronisés, dits résiduels (Frie-

drich et al., 2004). Pendant les quelques millisecondes suivant la présentation de l'odeur, une partie des M/T va graduellement se synchroniser par rapport aux oscillations des LFP, formant la population des cellules phasées. Quand le niveau global de synchronisation est faible, la spécificité à l'odeur des groupes synchronisés est forte, ce qui pourrait correspondre à une représentation de l'identité de l'odeur. Lorsque la synchronisation s'étend, la spécificité du groupe synchronisé diminue, mais reste spécifique à une catégorie d'odeur, l'augmentation de la corrélation pouvant alors permettre la représentation de la catégorie de l'odeur. Les potentiels d'action résiduels évoluent à l'opposé : ils sont largement synchronisés par rapport aux oscillations des LFP lors de la présentation de l'odeur et représentent la catégorie de l'odeur, puis ils se réorganisent et deviennent de moins en moins synchronisés, faisant émerger des paquets d'activité spécifique de l'identité fine de l'odeur. Ainsi, deux larges populations de neurones, selon que leurs potentiels d'action sont synchronisés ou pas sur l'oscillation, représentent chacun un type d'information sur l'odeur. À mesure que le temps s'écoule, la nature de l'information représentée glisse d'une population à l'autre. A tout instant, deux types d'information sont disponibles, catégorie et identité. Nous avons vu que la synchronisation semblait nécessaire pour résoudre des tâches olfactives difficiles (Stopfer et al., 1997). Ici, les neurones non synchronisés constituent en quelque sorte une mémoire de travail olfactive, contenant l'identité de l'odeur et allégeant la charge de travail d'une population synchronisée qui sera alors disponible pour représenter l'identité fine d'une nouvelle odeur.

Même si ces interprétations sont pour une grande part hypothétiques, elles s'appuient sur des données réelles qui laissent entrevoir la fascinante étendue des mécanismes tournant autour des mystérieux rythmes décrits par lord Adrian il y a maintenant déjà longtemps. Toutefois, à l'issue de cette section, on peut se demander si l'hypothèse du codage spatial est vouée aux oubliettes de la science.

1.5.6 Que reste-t-il du codage spatial ?

LA PROPOSITION DE LA REPRÉSENTATION DE L'INFORMATION OLFACTIVE par des mécanismes dynamiques n'est pas un nouveau paradigme destiné à remplacer l'ancien, mais bien à le compléter. Le concept évolue du «codage spatial de l'odeur» vers le «codage spatio-temporel de l'odeur».

La construction de la cavité nasale et l'expression des OR, la nature des projections

de l'épithélium olfactif vers le bulbe, mais également l'organisation cellulaire du bulbe olfactif rendent la dimension spatiale indissociable de la représentation de l'information olfactive.

- a) Les cornets olfactifs chez le rat sont des formes complexes constituées de circonvolutions membraneuses, génératrices de turbulences dans l'écoulement de l'air. Il a été proposé (Mozell, 1964, 1970; Mozell and Jagodowicz, 1973) que les cornets pourraient avoir un rôle comparable à un système de chromatographie gazeuse, l'épithélium olfactif et sa couche de mucus jouant le rôle de sorbant et l'air turbulent jouant le rôle de l'éluant. Les propriétés physiques d'une molécule, son poids, sa volatilité, son encombrement stérique, mais aussi son degré d'hydrophobicité vont constituer autant de paramètres modifiant sa progression dans la cavité nasale (Scott et al., 2006). Les ORN exprimant le même type de neurones sont répartis uniformément au sein de leur domaine d'expression, on les retrouvera donc aussi bien dans des zones de la muqueuse facilement accessibles, aussi bien aux molécules lourdes qu'aux molécules volatiles, que dans des recoins latéraux que seules les molécules très volatiles pourront atteindre (cf. figure 1.24). Ce principe de chromatographie pourrait être une explication des cinétiques variables d'activation des glomérules dans le bulbe (Spors et al., 2006). Il permet de détecter certaines propriétés de la molécule qui ne peuvent être mesurées par la simple interaction avec un récepteur sensoriel olfactif. Si ce système est avéré, il constitue un exemple de transformation d'une information spatiale (zones de la muqueuse activée par une molécule) en une information temporelle (cinétique d'activation des glomérules). Ainsi la représentation spatio-temporelle de l'information olfactive existerait dès l'appareil sensoriel.

- b) La synchronisation entre M/T dans les premiers instants de la stimulation est hautement corrélée à la carte d'activation glomérulaire : les cellules M/T appartenant à un même glomérule ont une forte tendance à adopter le même motif de décharge sur le cycle respiratoire, cette tendance correspond à une probabilité significativement supérieure pour une paire de M/T connectées au même glomérule que pour des paires contrôles, associées au hasard. La stimulation par une odeur augmente la différence de probabilité : lors de la stimulation, la probabilité d'avoir le même patron dans des paires contrôles est réduite par rapport à l'activité spontanée (Buonviso et al., 1992). D'autres études récentes (Chen et al., 2009; De Saint Jan et al., 2009) montrent également la très forte synchronisation entre M/T issues d'un même glomérule, indiquant que l'impact de la distribution spatiale des points d'entrée dans le bulbe se fait sentir encore au niveau des deutoneurones.

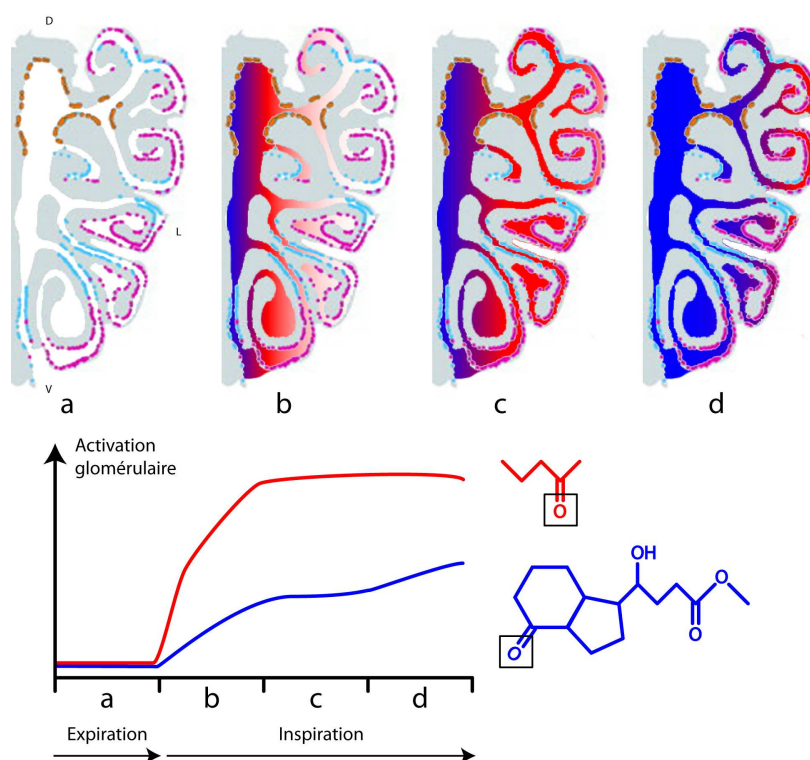


FIG. 1.24: Fonctionnement des cornets de la cavité nasale en tant que système chromatographique comme explication de la cinétique d'activation des glomérules.

En haut : Coupe frontale des cornets olfactifs du rat, D : dorsal, V : ventral, L : latéral. Les points de couleur correspondent aux positions révélées par hybridation in-situ des ORN exprimant un type de récepteur (orange : OR16, bleu : OR133, magenta : I7).

a, b, c et d : Progression, à différentes époques du cycle respiratoire, dans les cornets olfactifs de l'air contenant deux composés chimiques différents, indiqués par un code couleur. La représentation de cette progression est arbitraire.

a : Expiration. L'air dans les cornets de contient pas d'odeur.

b, c, d : Inspiration. La molécule légère et volatile (rouge) envahi très rapidement les cornets et contacte les récepteurs olfactifs en grand nombre. La molécule lourde et très polaire (bleu) sera gênée dans sa progression par sa faible volatilité et par les interactions avec le mucus, elle envahira les cornets avec une cinétique beaucoup plus lente.

En bas : Courbe d'activation du glomérule correspondant aux ORN exprimant le récepteur sensibles à la fonction cétone portée par les deux molécules. L'axe des ordonnées représente le niveau d'activation glomérulaire (unité arbitraire). On retrouve en abscisse les 4 étapes successives du cycle respiratoire a, b, c et d correspondant au panneau du haut. La cinétique des courbes varie avec la capacité de la molécule à contacter les récepteurs olfactifs. À droite : représentation des deux molécules prises arbitrairement en exemple, la fonction cétone est indiquée par le cadre noir. Noter la vaste différence de taille, de structure et de polarité entre les deux molécules.

Interprétation personnelle sur la base des travaux de M. Mozell et H. Spors.

- c) Une étude par traceurs fluorescents (Willhite et al., 2006) montre l'organisation en colonne de l'activité dans le bulbe, l'information spatiale sur la couche glomérulaire est probablement partiellement conservée dans sa projection vers les couches plus profondes.
- d) L'efficacité de la boucle synaptique mitrale/granule est variable dans l'espace (Lowe, 2002). La distribution spatiale des phénomènes excitateurs et inhibiteurs sur les M/T peuvent conduire à quatre situations différentes : initiation du potentiel d'action au niveau du soma avec propagation dans les dendrites, initiation du potentiel d'action au niveau des dendrites sans propagation (pas de transmission du potentiel d'action par l'axone), initiation du potentiel d'action au niveau dendritique et propagation uniquement dans l'axone (pas de propagation dans les dendrites), initiation du potentiel d'action au niveau des dendrites, propagation dans les axones et les dendrites (Chen et al., 2002).
- e) La synchronisation stochastique est d'autant plus efficace que le bruit inhibiteur reçu par les cellules M/T est corrélé (Galán et al., 2006). Lorsque une cellule M/T est fortement activée, elle va activer une centaine de cellules granulaires, ainsi dans l'entourage proche de cette cellule, le bruit inhibiteur sera fortement corrélé et entraînera un fort degré de synchronisation. De cette façon, la spatialisation de l'activité afférente glomérulaire se traduit dans les couches inférieures par la spatialisation d'un phénomène dynamique.

La représentation de l'information olfactive fait donc appel à des éléments de représentation spatiale et temporelle, étroitement imbriqués, aussi bien dans le système périphérique que sur la couche glomérulaire et dans les couches profondes du bulbe. Spatial et temporel sont donc probablement deux dimensions indissociables dans cette modalité. Cependant, si la composante spatiale commence à être assez bien connue, il n'en va pas de même pour la composante temporelle, les mécanismes, rôles et propriétés des phénomènes dynamiques du bulbe étant encore essentiellement à l'état d'hypothèses. L'étude de ces phénomènes permet d'avancer vers une compréhension plus approfondie de la représentation de l'information olfactive dans l'encéphale.

1.6 Problématique

1.6.1 L'information olfactive.

CE QUE L'ON DÉSIGNE PAR LE TERME D'ODEUR est en fait un ensemble de molécules qui procure une sensation olfactive. Chacune de ces molécules possède un certain nombre de traits physico-chimiques : forme et longueur de la chaîne carbonée, présence et position de fonctions chimiques mais aussi encombrement stérique, poids moléculaire, hydrophobicité, volatilité etc... Lorsque ce mélange pénètre dans la cavité nasale, il constitue alors une masse de traits physico-chimiques et l'appareil sensoriel doit analyser cette masse d'information. Comme il est décrit dans la section 1.4.1.1, les récepteurs olfactifs vont être activés spécifiquement par la présence de certains traits (Zhao et al., 1998; Malnic et al., 1999; Araneda et al., 2000). Le signal afférent sur la couche glomérulaire du bulbe olfactif est organisé en fonction des faisceaux de projection en provenance des neurones sensoriels (Astic and Saucier, 1986; Saucier and Astic, 1986; Vassar et al., 1994; Mombaerts et al., 1996). Cette organisation, de fait, introduit un élément spatial de représentation de l'information : la spécificité des récepteurs olfactifs se traduit par une spécificité spatiale de l'activation des glomérules.

En conséquence, la conception de la stratégie de représentation de l'information olfactive a longtemps reposé sur ce seul principe de codage spatial. Cependant un certain nombre d'arguments mentionnés dans la partie 1 suggère que ce codage spatial seul n'est pas suffisant pour expliquer le fonctionnement de la structure. Brièvement, le système olfactif est capable de faire la différence entre des odeurs complexes (mélange de plusieurs molécules) évoquant des cartes spatiales similaires et très recouvrantes (Uchida et al., 2000; Uchida and Mainen, 2003) ; le bulbe partiellement détruit est toujours capable de représenter dans une certaine proportion l'information olfactive perçue (Lu and Slotnick, 1998) ; de par la connectivité particulière entre neurones principaux et interneurones bulbaires dans la couche EPL (cf. section 1.4.3), l'activité des cellules mitrales et des cellules à panache ne peut être confinée précisément dans les contours de la carte spatiale glomérulaire.

1.6.2 Rôle putatif des oscillations bulbaires.

LA PRÉSENCE ÉPISODIQUE D'OSCILLATIONS dans le signal électrophysiologique enregistré dans le bulbe olfactif en réponse à une stimulation olfactive a reçu une attention croissante à mesure que les hypothèses sur le principe de représentation de l'information olfactive ont évolué d'une conception purement spatiale vers une conception spatio-temporelle. Le principe est en théorie assez simple : à tout instant l'information n'est représentée que de façon partielle dans le réseau, suivant une organisation spatiale, et seule l'intégration de ces représentations partielles sur une certaine période de temps fournit une représentation complète. Pour un certain nombre d'auteurs, les oscillations des LFP servent à cette intégration et constituent une référence temporelle dans le réseau permettant l'organisation précise dans le temps d'événements successifs, un peu comme un métronome assure l'organisation temporelle précise d'une interprétation musicale. Pour d'autres, au contraire, les oscillations sont un épiphénomène, un corollaire du fonctionnement de la structure sans rôle fonctionnel. La question n'est pas tranchée, mais de toute façon ces deux positions ne sont pas inconciliables, les oscillations en elles mêmes pouvant ne pas avoir de rôle fonctionnel à proprement parler tout en étant d'une certaine façon la manifestation de mécanismes dynamiques qui auraient, eux, un rôle fonctionnel. Le but général de cette thèse est d'éclaircir quelque peu le rôle des oscillations bulbaires, lentes et rapides.

1.6.3 Questions posées.

COMMENT MESURER le degré de l'implication fonctionnelle des oscillations ? En musique, le tempo indique l'allure d'exécution d'une œuvre, et cette simple information suffit souvent à donner une coloration émotionnelle à la musique (le terme *allegro*, correspondant à un rythme rapide, indique souvent un morceau gai, enjoué). De ce fait, le battement du métronome, s'il n'est pas la musique, est néanmoins porteur d'information relative à la musique. Si, dans le bulbe olfactif, les oscillations des LFP participent à la représentation de l'information olfactive, on peut s'attendre à ce que certaines caractéristiques de ces oscillations renseignent sur certains aspects de la représentation. Déjà, des travaux chez l'animal vigile (Martin et al., 2004) ont montré que le traitement cognitif d'une odeur (via l'apprentissage d'une tâche comportementale impliquant des indices olfactifs) modifiait l'organisation temporelle des oscillations des LFP. Les LFP contiennent

donc de l'information sur la valence de l'odeur, mais après plusieurs séances d'entraînement au cours desquelles de nombreuses aires du cerveau ont été recrutées, cette modification des LFP est donc probablement le résultat de processus «top-down». Nous avons voulu déterminer si les oscillations des LFP contenaient également de l'information à un bas niveau de traitement, c'est à dire directement en lien avec l'odeur perçue. Notre première étude, cherche donc à établir la correspondance entre les caractéristiques des oscillations des LFP et les caractéristiques du signal sensoriel, à savoir les traits physico-chimiques des odeurs.

Si les oscillations des LFP sont impliquées dans la représentation spatio-temporelle de l'information olfactive, quel rôle peuvent-elles bien y jouer ? Nous avons déjà mentionné que le principe de représentation spatio-temporelle s'appuie sur la théorie des assemblées de neurones (voir section 1.5.3). L'un des rôles possibles pour les oscillations des LFP dans ce cadre théorique est celui d'organisateur temporel, augmentant la précision temporelle des événements, mettant le signal en forme afin qu'il soit lu correctement par les structures en aval. Dans le cas du système olfactif, il existe un autre organisateur temporel d'importance : le rythme respiratoire. La respiration impose une entrée cyclique de l'information sensorielle dans l'appareil olfactif. Cette modulation de l'entrée sensorielle se ressent ensuite dans le bulbe olfactif, tant au niveau des LFP que des activités unitaires. Cette modulation respiratoire doit donc être comptée au rang des phénomènes dynamiques dans le bulbe olfactif, et son rôle potentiel d'organisateur temporel dans l'activité de cette structure doit être étudiée.

Jusqu'à présent les études chez le mammifère ne proposent que des vues morcelées de l'ensemble des phénomènes dynamiques évoquées par la stimulation olfactive. Chaput et al. étudient la relation entre le cycle respiratoire et la décharge des cellules M/T (Chaput et al., 1992), tandis que Margrie et Schaefer étudient la relation entre oscillation lente du potentiel de membrane et décharge de AP au niveau unitaire (Margrie and Schaefer, 2003). Kashiwadani et al. explorent la synchronisation des cellules M/T et le phasage de leur activité sur les oscillations du LFP dans la bande gamma chez le lapin, mais n'abordent pas l'influence du rythme respiratoire (Kashiwadani et al., 1999). L'étude la plus complète est celle de Buonviso et al. qui analyse le décours temporel des oscillations dans les bandes bêta et gamma par rapport au cycle respiratoire, ainsi que l'activité des neurones dans les différentes couches du bulbe, toujours par rapport au cycle respiratoire (Buonviso et al., 2003). Cette étude montre que l'organisation temporelle de l'activité des cellules individuelles et celle des oscillations du LFP par rapport au cycle respiratoire sont similaires.

Le but de notre deuxième étude est d'obtenir une vue intégrée de l'activité dynamique du bulbe, et notamment de l'influence organisatrice des différents rythmes. En effet, nous nous sommes demandé si, de la même façon que le rythme respiratoire structure temporellement les activités individuelles des cellules, les oscillations rapides peuvent avoir une influence sur ces décharges. Pour répondre à cela nous avons choisi d'estimer la cohérence temporelle entre ces deux éléments, notamment à travers leur relation de phase. Parallèlement, nous nous sommes posé la question des interactions entre ces différents rythmes : quelle conséquence l'interaction entre rythmes lent et rythmes rapides peut avoir sur les décharges unitaires des cellules ? Est-ce que cela apporte un degré d'organisation supplémentaire ? Répondre à ces questions implique de détailler l'enchevêtrement des différents rythmes et peut apporter des réponses sur le rôle fonctionnel des phénomènes dynamiques bulbaires.

PARTIE 2



RÉSULTATS

2.1 Première étude

LA PRESSION DE VAPEUR ET LA QUALITÉ DES ODEURS MODIFIENT L'ORGANISATION TEMPORELLE DES OSCILLATIONS DES POTENTIELS DE CHAMPS LOCAUX DANS LE BULBE OLFACTIF DU RAT ANESTHÉSIÉ.

Odor vapor pressure and quality modulate local field potential oscillatory patterns in the olfactory bulb of the anesthetized rat.

Tristan Cenier, Corine Amat, Philippe Litaudon, Samuel Garcia, Pierre Lafaye de Micheaux, Benoît Liqueur, Stéphane Roux et Nathalie Buonviso.

Publié dans *European Journal of Neuroscience*, accepté le 31 janvier 2008.

UNE QUESTION CENTRALE dans la recherche sur l'olfaction est la stratégie utilisée dans l'encéphale pour permettre la représentation de l'information olfactive. À ce jour, un grand nombre d'études suggèrent que les traits physico-chimiques des molécules sont représentés par le biais d'une activation spatio-temporelle du bulbe olfactif, tant au niveau de la couche glomérulaire qu'au niveau de la couche mitrale. Les deutoneurones interagissent avec un grand nombre d'interneurones inhibiteurs et le produit de cette interaction est une organisation temporelle de l'activité des LFP. Nous avons voulu déterminer si une partie de cette organisation temporelle pouvait correspondre directement aux traits physico-chimiques des odeurs. Pour ce faire, nous avons enregistré, chez le rat anesthésié à l'uréthane et respirant librement, le signal LFP évoqué par un panel d'odeurs variant entre elles par la longueur de leur chaîne carbonée et/ou leur fonction chimique. En accord avec nos études précédentes, nous avons montré que la stimulation olfactive évoquait des oscillations des LFP dans deux bandes de fréquence, bêta (10–35 Hz) et gamma (40–80 Hz). L'analyse précise de ces oscillations a révélé que si les variations dans les caractéristiques intrinsèques de ces oscillations (fréquence, durée, position par rapport au cycle respiratoire) sont indépendantes des caractéristiques des odeurs à l'intérieur de chaque bande de fréquence, l'organisation temporelle générale des oscillations est, elle, dépendante de ces caractéristiques. Les odeurs possédant une faible pression de vapeur, et donc probablement présentes à des concentrations faibles dans la cavité nasale lors de la stimulation, évoquent en majorité des oscillations des LFP dans la bande bêta uniquement, à l'opposé les odeurs possédant une forte pression de vapeur évoquent en majorité le profil classique d'oscillations alternées dans les bandes bêta et gamma. La corrélation entre pression de vapeur et probabilité d'apparition d'oscillations gamma est plus forte pour les sous-groupes d'odeurs portant la même fonction chimique. Nous concluons que

la fonction chimique d'une odeur détermine dans ses grandes lignes le type d'oscillation qu'elle va évoquer. Nous proposons que, la pression de vapeur d'une molécule déterminant l'intensité de la stimulation olfactive, cette intensité déterminerait le profil d'oscillations qui vont être évoquées lors de la stimulation.

Le rôle des oscillations des LFP dans les mécanismes de représentation de l'odeur est encore peu connu, mais une hypothèse répandue voudrait que ces oscillations forment un cadre temporel permettant l'organisation des événements cellulaires et notamment la formation d'assemblées de neurones. Dans cette optique, le fait que les oscillations reflètent de par leur organisation temporelle certaines propriétés chimiques et physiques du stimulus permettrait de renforcer leur participation dans ce mécanisme, en organisant l'activité bulbaire différemment en fonction de la catégorie chimique de l'odeur ou de l'intensité perçue de la stimulation.

Odor vapor pressure and quality modulate local field potential oscillatory patterns in the olfactory bulb of the anesthetized rat

Tristan Cenier,¹ Corine Amat,¹ Philippe Litaudon,¹ Samuel Garcia,¹ Pierre Lafaye de Micheaux,^{2,3} Benoît Liquet,² Stéphane Roux⁴ and Nathalie Buonviso¹

¹Neurosciences Sensorielles, Comportement, Cognition, CNRS UMR5020, IFNL, Université Claude Bernard Lyon 1, 50 avenue Tony Garnier, 69366 Lyon cedex 07, France

²Université Pierre Mendès France, Département de Statistique du Laboratoire Jean Kuntzman, Grenoble, France

³Institut des Neurosciences de Grenoble, Grenoble, France

⁴Laboratoire de Physique, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France

Keywords: coding, local field potentials, molecular features, olfactory bulb, oscillations, respiratory cycle

Abstract

A central question in chemical senses is the way that odorant molecules are represented in the brain. To date, many studies, when taken together, suggest that structural features of the molecules are represented through a spatio-temporal pattern of activation in the olfactory bulb (OB), in both glomerular and mitral cell layers. Mitral/tufted cells interact with a large population of inhibitory interneurons resulting in a temporal patterning of bulbar local field potential (LFP) activity. We investigated the possibility that molecular features could determine the temporal pattern of LFP oscillatory activity in the OB. For this purpose, we recorded the LFPs in the OB of urethane-anesthetized, freely breathing rats in response to series of aliphatic odorants varying subtly in carbon-chain length or functional group. In concordance with our previous reports, we found that odors evoked oscillatory activity in the LFP signal in both the beta and gamma frequency bands. Analysis of LFP oscillations revealed that, although molecular features have almost no influence on the intrinsic characteristics of LFP oscillations, they influence the temporal patterning of bulbar oscillations. Alcohol family odors rarely evoke gamma oscillations, whereas ester family odors rather induce oscillatory patterns showing beta/gamma alternation. Moreover, for molecules with the same functional group, the probability of gamma occurrence is correlated to the vapor pressure of the odor. The significance of the relation between odorant features and oscillatory regimes along with their functional relevance are discussed.

Introduction

The olfactory epithelium contains a large panel of olfactory receptors that can number up to 1000 in some rodent species (Buck & Axel, 1991). At the molecular level, each olfactory receptor is tuned to one particular structural feature of a molecule (Zhao *et al.*, 1998; Malnic *et al.*, 1999; Hallem & Carlson, 2006). Olfactory sensory neurons expressing the same olfactory receptor project their axons onto one or very few glomeruli in the olfactory bulb (OB) (Vassar *et al.*, 1994; Mombaerts *et al.*, 1996; Mori *et al.*, 2006). Thus, specific odor stimulations will elicit specific patterns of glomerular activation. This has been confirmed by studies based on several techniques, such as optical imaging (Rubin & Katz, 1999; Uchida *et al.*, 2000; Belluscio & Katz, 2001) or 2-deoxyglucose uptake (Jourdan *et al.*, 1980; Johnson *et al.*, 1998).

Many consider the glomerulus to be the entry point into an activity-dependent functional unit organized in columns (Buonviso & Chaput, 1990; Buonviso *et al.*, 1992; Willhite *et al.*, 2006). One would therefore expect a reproduction of the glomerular spatial map onto the

mitral/tufted cell layer. Consistent with this view, Mori's group showed that individual mitral/tufted cells respond to a range of odors that share a specific combination of molecular features (Imamura *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1992; Katoh *et al.*, 1993). However, the secondary dendrites of mitral/tufted cells extend over long distances in the external plexiform layer. This extension allows mitral/tufted cells from distant glomeruli to communicate via reciprocal synapses on granular interneurons (Rall *et al.*, 1966; Mori *et al.*, 1983; Shepherd & Greer, 1998).

This vast network of synaptic connections is thought to result in the temporal patterning of the local field potential (LFP) signal. This LFP signal received increasing attention as the potential role of its underlying mechanisms in information coding was revealed (Wehr & Laurent, 1996; Friedrich & Laurent, 2001). Indeed, oscillations of the LFP signal are correlated to the transient synchronization of a population of neurons, a phenomenon that has been shown to be functionally relevant for the discrimination of closely related odorants (Stopfer *et al.*, 1997). Modifications of LFP patterns also seem to reflect memorization and learning (Martin *et al.*, 2004). In mammals, bulbar LFPs and breathing are closely related (Buonviso *et al.*, 2003), suggesting that LFPs are partially driven by the bulbar afferent input. In such conditions, it can be expected that odor molecular features will

Correspondence: Dr Tristan Cenier, as above.

E-mail: tcenier@olfac.univ-lyon1.fr

Received 22 May 2007, revised 26 November 2007, accepted 31 January 2008

influence bulbar LFP signals by determining bulbar spatio-temporal input patterns. To our knowledge, it has not yet been shown that different molecular features can differentially affect the LFP bulbar signal in an anesthetized animal.

In this study, we systematically analysed the characteristics of the LFPs evoked by similar or dissimilar aliphatic, straight-chain chemicals with variations in either carbon-chain length (L) or functional group (F). Our goal was to find out if odor quality could influence the temporal pattern of LFP oscillatory activity in the OB.

Materials and methods

Preparation and recording apparatus

Experiments were performed on freely breathing, anesthetized male Wistar rats weighing 200–300 g (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France). Anesthesia was performed through an intraperitoneal injection of urethane (1.5 g/kg). Supplemental doses were delivered during experimentation when necessary. All surgical procedures were conducted in strict accordance with the European Community Council guidelines and received approval n° DSV 69387473 from veterinary services. Animals were immobilized with ear and teeth bars in a stereotaxic apparatus. The skull was exposed and a small bone window was drilled above the OB to grant full access to its dorsal aspect. Neuronal activity was recorded within the mitral cell layer using a 16-channel silicon neural probe (Neuronexus Technologies). The 16 recording points were dispatched linearly along the silicone tip at 50 μm intervals. The electrode was lowered vertically along the dorso-ventral axis and the bulb entry point was chosen so that most of the recording points lay near the mitral cell layer. In an effort to avoid spatial odor-specific glomerular activation effects, recording sites were dispatched along the entire antero-posterior axis of the OB and the entire dorso-ventral axis of the lateral and medial layers. The extracellular signal was acquired in the full band (0–5000 Hz) and digitalized with a high-speed 16-channels acquisition device (wavebook 512A and wavebook 10A, IOtech) at a 10 kHz sampling rate. Fourteen channels, along with two channels dedicated to the continuous recording of respiratory signal and stimulus onset, were connected to the 14 lowest points on the electrode tip. Note that the two topmost recording points on the electrode were not used.

Odors and acquisition protocol

Odors were simple linear aliphatic compounds and either the main L or the F associated with this chain varied between odors. The odors used are listed in Table 1. Stimuli were delivered with a custom-made olfactometer at 1/6 of the saturation vapor pressure (SV_p). The vaporized odors were injected in a constant and stable humidified airflow so that there were no variations in the overall flow; this was important, as we wanted to avoid any artifacts due to mechanical stimulation of the olfactory mucosa at odor onset and offset. Recording epochs were 15 s long and were sub-divided in three 5 s epochs corresponding to pre-stimulus basal activity, stimulus-related activity and post-stimulus activity, respectively.

Once the electrode was satisfactorily placed close to or within the mitral cell layer, stimulations were delivered in a regular sequence comprised of 15 s of recording, including 5 s of actual stimulation, and 90 s of rest. Within a sequence, odors with the exception of D07 were randomized. D07 was always delivered last, because the rinsing time for this odor is greater than 90 s. Preliminary experiments showed that the order of presentation had no effect on the recorded patterns (data not shown).

TABLE 1. Panel of odors used in this study

Carbon chain length (L)	Chemical function (F)	
	Designation	Symbol
Alcohol		
5	Pentanol	A05
6	Hexanol	A06
7	Heptanol	A07
10	Decanol	A10
Ester		
5	Ethyl-valerate	E05
6	Ethyl-hexanoate	E06
7	Ethyl-heptanoate	E07
10	Ethyl-decanoate	E10
Ketone		
7	2-heptanone	K07
Aldehyde		
7	Heptanal	D07

Indicated for each odorant are the official name in chemical nomenclature and the symbol used in this report.

Respiratory cycle recording and analysis

Respiration was recorded with a home-made monitoring device based on a fast response time thermodilution airflow sensor (bidirectional micro bridge mass airflow sensor, AWM 2000 family, Micro Switch Honeywell). This setup was extensively described by Roux *et al.* (2006). Briefly, the time dimension of the respiratory epochs (inspiration and expiration), which can differ from trial to trial, was converted into a phase dimension defined as $[-\pi, 0]$ and $[0, \pi]$ for inspiration and expiration, respectively. The zero point was set to be the transition between inhalation and expiration. In contrast to time representation, the phase representation was common to all trials. Phase representation of the respiratory cycle was used as a normalized time basis to average olfactory neural events. Thus, the respiratory phase of any oscillatory event can be accurately evaluated and represents the time of occurrence of an event relative to the respiratory cycle.

LFP analysis

The LFPs present bursts of oscillations and are highly non-stationary events. They are not continuous in mammals and may vary in amplitude or shift in frequency. Additionally, they occur in several frequency bands and produce recordings that are often quite noisy. Therefore, we chose a method based on a wavelet transform of the signal that addresses the aforementioned characteristics of LFPs. As the method is extensively described by Roux *et al.* (2007), we give here only a brief summary.

Wavelet transform

The wavelet transform of a signal (Mallat, 1989) is the result of the convolution of the signal and a function of variable frequency (in our case, the Morlet wavelet) (Kronland-Martinet *et al.*, 1988). It yields a matrix of coefficients, T_{ψ} , representing the frequency content of the signal. The T_{ψ} matrix is then normalized to generate a time-scale energy density distribution matrix P_{ψ} that is adjusted so that the overall sum of all elements in P_{ψ} equals 1.

For visualization purposes, the P_{ψ} matrices were converted into a time–frequency representation in which the energy density distribution was color coded. Because a high graphic resolution was not necessary, the P_{ψ} matrices were computed from a filtered and under-sampled version of the raw signal (filter, 0–200 Hz; sampling rate, 200 Hz).

As the duration of respiratory cycles can change over time, time–frequency representations were resampled to fit the linearized respiratory cycles. Energy density was no longer represented as a function of time and frequency but instead as a function of respiratory phase and frequency. Several phase–frequency representations can be compared and averaged while preserving the temporal course of LFPs. However, this requires normalization of the energy in phase–frequency representations. Phase–frequency representations were normalized over the pre-stimulus period. Theoretical and practical aspects of time–frequency representations based on wavelet transforms have been described by Vialatte *et al.* (2007).

Wavelet ridge extraction: information about the oscillatory epochs

A particular application of wavelet analysis was implemented to extract the characteristics of the LFP bursts from the P_{Ψ} matrix. The analysis was performed in two steps. The first step involved a sweep of the low time-resolution coefficient matrix (i.e. the matrix computed from the under-sampled signal) for the detection of local maximum energy points, which correspond to the peaks of oscillatory activity. A threshold T_s was set for the detection of maxima to segregate signal from noise. T_s was defined as

$$T_s(f) = \overline{E(f)} + SD \cdot b, \quad (1)$$

where $E(f)$ is the averaged energy of the pre-stimulus period at frequency f , SD the SD of the same period and b an arbitrary constant (set to 6 in our case).

For each local maximum detected above the threshold, a higher resolution wavelet transform was then computed locally to detect the path of lowest energy decrease. This path was defined as the wavelet ridge. For each point (ϕ, f) of the ridge, we obtained instantaneous frequency and phase with $E(f) = T$. When the algorithm proceeded to a point at which $E(\phi, f_0) < T_s$, the detection process stopped. All extracted characteristics were stored in a MySQL engine database (MySQL AB). Several processing steps are summarized in Fig. 1 (top).

Data computation

After the LFP analysis step, all data were stored in a MySQL engine database. For each burst of oscillatory activity evoked by odor stimulation, the following parameters were stored: frequency, respiratory phase at the point of maximum energy and duration (expressed in radian, from 0 to 2π). Data with poor signal-to-noise ratios were eliminated. Wavelet ridge extraction was performed on the remaining recordings. As each burst was detected from the 14 recording points of the electrode, burst characteristics were averaged across the 14 points in the gamma or beta bands. Therefore, each individual odor stimulation was processed into a set of oscillation features comprising an average frequency, average duration and average respiratory phase. When the LFP oscillated in both bands, the set contained separate average values for each band. Data analysis was performed on 25 repetitions of the set of odors, recorded in 14 different animals (cf. Fig. 1). Some animals were

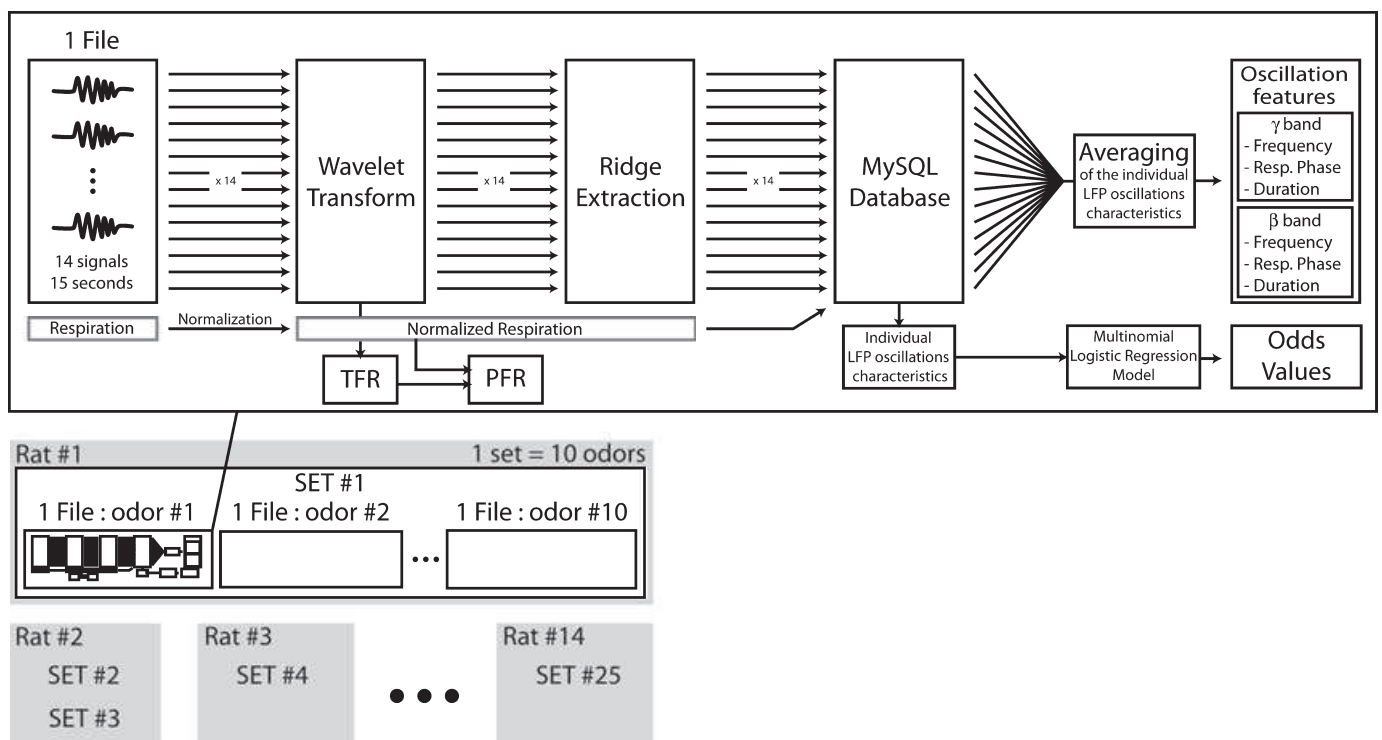


FIG. 1. From recording sessions to analysed results. Top: Signal-processing suite. From left to right: each file, which contains 14 signals from the 14 channels of the electrode plus the respiratory monitoring, undergoes several steps of data processing, including wavelet transform and ridge extraction. The results are stored in a database and visualized as time–frequency representations (TFRs). After normalization, the respiration is used to construct phase–frequency representations (PFRs) and measure the respiratory phase parameter. Each file produces a set of intrinsic oscillation features. All files are used both to obtain odds values and to construct a multinomial logistic regression model. Bottom: Organization of the recording sessions and data nomenclature. Each animal was used to record one or several sets; each set contains 10 files, each corresponding to one of the 10 odorants. A total of 25 sets were recorded from 14 different animals. From the resulting 250 files, 43 were eliminated because of noise or electrophysiological parasites.

used to record several sets of signals from different recording sites. The 25 sets are considered statistically independent. After LFP analysis and averaging, statistical analysis was performed for 207 sets of oscillation features.

Statistical analysis

Each odorant can be described via its F and L (see Table 1). Each set of oscillation features contains averaged LFP characteristics describing respiratory phase, duration and frequency. The variable F was qualitative, whereas L was quantitative. Therefore, each statistical unit involves both an odor and a set of oscillation features. All of the statistical analyses were performed using R (R: A Language & Environment for Statistical Computing, R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, 2006) and SAS (SAS Institute Inc., SAS 9.1.3 Help and Documentation, Cary, NC, USA, SAS Institute Inc., 2000–04) statistical software. The aim was to study the relationship between the odors (F and L) and the oscillating burst characteristics (respiratory phase, duration and frequency).

First, we used the R k-means clustering technique (Hartigan & Wong, 1979) to cluster observations based on their frequencies. We obtained two burst groups, one with low frequency and one with high frequency. We have referred to these groups as beta and gamma bursts. Next, histograms were made with the R hist function to visualize the differences in the duration distribution between gamma and beta bursts. The same procedure was completed for the respiratory phase variable. To investigate if there were significant mean differences for the frequency, duration and respiratory phase variables between these two groups, we performed a MANOVA and ANOVA constructed from the whole data set, using the cluster factor (which corresponds to the classification of the bursts in the gamma or beta band or the k-means separation of the two clusters). A Fisher test was also applied to compare the variability of duration and respiratory phase for each group. Two other ANOVAs were conducted on the characteristics (frequency, duration and respiratory phase) of gamma and beta bursts, using odor identity as a factor.

Second, we used a multinomial logistic regression to explain the different observed oscillatory LFP patterns (Long, 1997). We performed this regression via the SAS CATMOD procedure and the explanatory variables were L and F. This model enabled us to compute the probability of obtaining a certain oscillatory pattern, given L and F. It was also possible to obtain the odds

$$\Omega_{i,j}(L, F) = \frac{P(\text{pattern} = i|L, F)}{P(\text{pattern} = j|L, F)}, \quad i, j = 1, 2, 3,$$

which gives the probability ratio *i* pattern : *j* pattern evoked by a specific odorant. In this framework, Wald and likelihood ratio tests were performed to examine effect significance and model validity. Finally, we calculated the correlation factor between odds values and SVp with R using the Pearson method.

Results

Twenty-five recording sessions were performed on 14 adult Wistar male rats. Each set gathered 10 recordings, with one recording per odor. After wavelet transform processing, files were averaged as described in Materials and methods. The following results were obtained through analysis of the 207 recording files.

TABLE 2. ANOVA summary: oscillation feature comparison between the two frequency bands

Comparisons and variables	Factor	F ratio	P-values
MANOVA	Cluster	$F_{2,533} = 95.206$	$P \ll 0.001^{***}$
ANOVA			
Fr	Cluster	$F_{2,533} = 600.82$	$P \ll 0.001^{***}$
Ph	Cluster	$F_{2,533} = 4.999$	$P = 0.0071^{**}$
Du	Cluster	$F_{2,533} = 178$	$P \ll 0.001^{***}$

Influence of the cluster factor on the frequency (Fr), duration (Du) and respiratory phase (Ph) characteristics of the odor-evoked LFP oscillations. Significance levels are indicated with standard annotations (1% > ** > 0.1% > ***). The cluster factor corresponds to the clusters defined by the k-means tool.

Molecular features do not determine the intrinsic characteristics of LFP oscillations

Odor-evoked LFP oscillations are characterized by their oscillatory frequency, duration and respiratory phase. Based on their oscillatory frequency, we distinguished two categories of bursts: fast bursts referred to as gamma oscillations, with frequency ranging from 40 to 80 Hz, and slow bursts referred to as beta oscillations, with frequency ranging from 10 to 35 Hz. Objective classification into beta or gamma categories was performed using the k-means clustering tool. Using this classification as a factor (designated as 'cluster factor'), an ANOVA was performed on the characteristics of the bursts. The results shown in Table 2 reveal that bursts classified as beta or gamma may also be sorted based on their duration and respiratory phase values. The characteristics of beta and gamma bursts are illustrated in Fig. 2. Bursts in the gamma band are characterized by a short duration and a respiratory phase mainly centered around 0, which indicates that these bursts occur mainly at the transition between inspiration and expiration. Conversely, bursts in the beta band are characterized by a long duration and a significantly variable respiratory phase (Fisher test, P -value $\ll 0.001$).

We then analysed the effect of the 'odor identity' factor on the characteristics of the bursts (ANOVA, cf. Table 3). Within the gamma range, odor had no influence on any of the characteristics. However, in the beta range, the respiratory phase of the bursts appears to vary significantly with the odor factor. This accounts for the variability in respiratory phase characterizing beta bursts in Fig. 2. In conclusion, the only oscillation intrinsic feature varying with odor is the respiratory phase of beta oscillations.

Odor quality determines the temporal patterning of bulbar oscillations

We showed that different odors evoke LFP bursts with very little variation in their intrinsic characteristics. However, it appeared that different odors induced oscillations in the beta and/or gamma ranges with different probabilities. Earlier studies (Buonviso *et al.*, 2003, 2006) reported that the two oscillatory regimes were related to the breathing cycle in an alternating fashion (Fig. 3a and b). Gamma oscillations occur around the transition between inspiration and expiration, whereas beta oscillations occur primarily during expiration and its subsequent plateau. The use of a large set of odorants in this study allowed us to observe a temporal pattern of LFP oscillations that we did not describe in our previous studies. An example of such a pattern is presented in Fig. 3b. Surprisingly, the

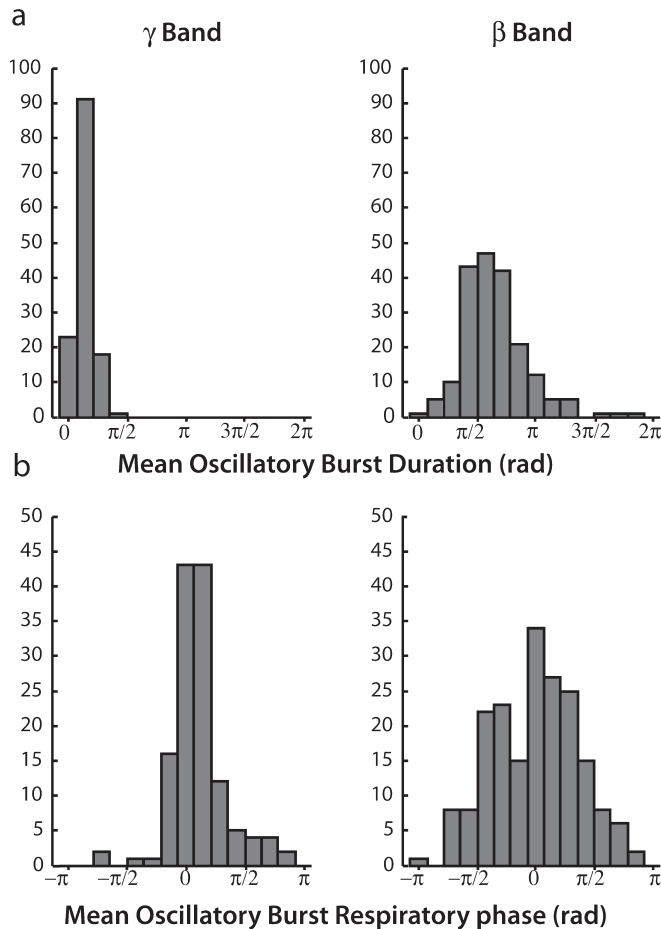


FIG. 2. Intrinsic oscillation feature comparison between the two frequency bands. (a) Distribution of oscillatory burst durations in the gamma (left) and beta (right) bands. This analysis is based on non-averaged LFP characteristics, regardless of the odorant used for the stimulation. Oscillations in the gamma band are highly reproducible and characterized by a short duration. (b) Distribution of respiratory phase of the gamma (left) and beta (right) bursts. Phase 0 corresponds to the transition between inspiration and expiration. The respiratory phase of beta oscillations is spread out over the entire respiratory cycle.

TABLE 3. ANOVA summary: molecular features do not determine the intrinsic characteristics of LFP oscillations

ANOVA variable	Factor	F ratio	P-value
Gamma band			
Fr	Odor	$F_{9,115} = 1.032$	n.s.
Ph	Odor	$F_{9,115} = 1.136$	n.s.
Du	Odor	$F_{9,115} = 1.179$	n.s.
Beta band			
Fr	Odor	$F_{9,181} = 1.659$	n.s.
Ph	Odor	$F_{9,181} = 2.186$	0.025*
Du	Odor	$F_{9,181} = 1.212$	n.s.

Influence of the odor identity factor on the intrinsic characteristics of odor-evoked bursts elicited in the gamma and beta ranges. Gamma bursts appear not to vary with the odor. The odor identity factor does have a significant effect on the respiratory phase (Ph) of odor-evoked bursts in the beta range. Significance levels are indicated with standard annotations (ns > 5% > * > 1%). Du, duration; Fr, frequency.

pattern is mainly characterized by a lack of activity in the gamma band and an occasional shift in the respiratory phase of the beta bursts.

Although both patterns could be observed in response to stimulation by any given odor from our set, we observed a strong predominance of this latter pattern in response to odors containing the alcohol chemical group. Faced with this observation, we formulated the hypothesis that the chemical features of odors may influence the temporal pattern of LFP oscillatory activity. To test this hypothesis, we used our data as a basis to construct a statistically valid model of the odor-related patterning of bulbar oscillations. This model was then used to predict the probability that an odor would elicit any one of the following three oscillatory patterns: (i) alternating bursts of gamma and beta oscillations (standard pattern); (ii) beta oscillatory bursts with no activity in the gamma band (gammaless pattern); or (iii) gamma oscillatory bursts with no activity in the beta band (betaless pattern). Figure 4 shows the model's predictions for the probability of each available combination of L and F eliciting the three LFP patterns. It appears that the probability for each pattern (standard, betaless and gammaless) varies with F and L. A Wald test was used to evaluate the significance of the model. It yielded a *P*-value of 0.05 for the L factor and a *P*-value less than 0.001 for the F factor. The two leftmost columns in Fig. 4 show the variations in pattern probabilities related to L for alcohol and ester molecules. As L increases (from 5 to 10), so does the probability of eliciting a gammaless pattern. Conversely, the probability of eliciting a standard pattern decreases along this same interval. Hence, the results obtained from this model suggest that LFP patterns, if not precisely odor-specific, are still influenced by the chemical characteristics of odors. In a preliminary experiment, we compared the LFP patterns elicited in four distinct regions of the OB (antero-medial, antero-lateral, postero-medial and postero-lateral quadrants) by several odors. Data analysis revealed no significant difference in LFP activity between quadrants. We are therefore confident that the differences in patterns that we see here are related to odor features and not to recording site.

Odor vapor pressure determines the probability of gamma occurrence within the limits of a chemical family

The multinomial logistic regression revealed that odor identity, i.e. L/F pair, determines the probability of oscillation temporal patterning. However, a recent study has demonstrated that odor vapor pressure determines the range of oscillatory frequency (Lowry & Kay, 2007). Therefore, in a last step, we wanted to verify that the variations in temporal pattern that we observed were not simply due to differences in vapor pressure within our odor set. We proceeded as follows. We had to quantify the variation in oscillation temporal patterning induced by each odor. This was achieved by calculating an 'odds value' representing the ratio of the probability of eliciting the standard pattern over the probability of eliciting the gammaless pattern (beta and gamma/beta). Each odor is characterized by one and only one odds value reported in Fig. 4. An odds value less than 1 indicates that an odor displays a higher probability of eliciting a gammaless pattern than a standard pattern. As all odors were delivered at the same fraction of their SVp, we were able to test the correlation between the probability of an odor inducing gamma oscillations (odds values) and SVp of the odor. The correlation between odds values and SVp was determined with the inbuilt R function and evaluated with the Pearson test. If SVp were the only parameter determining the pattern, SVp and odds values should correlate perfectly. As illustrated in Fig. 5a, a good correlation ($r = 0.5$, Pearson *P*-value << 0.0001) was found between the two parameters. However, when odors are sorted into sub-groups (alcohol and ester groups), we found that SVp and odds values were more strongly correlated ($r = 0.9$ for each group, Pearson

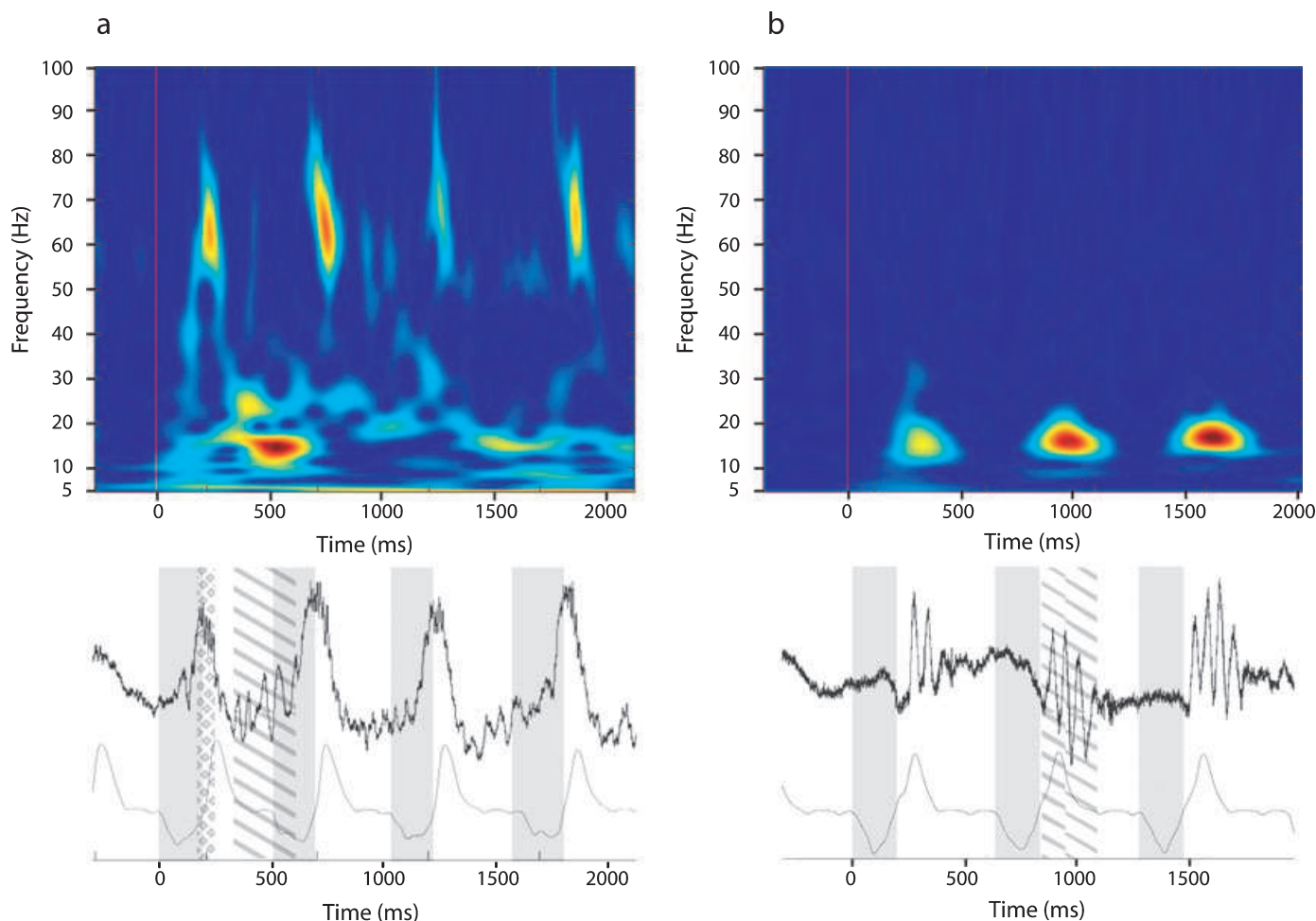


FIG. 3. Time–frequency representations (TFRs) of the standard and gammaless patterns. TFRs of bulbar LFP signals. Here, we presented only 2.5 s periods containing a short part of the pre-stimulus period and three or four respiratory cycles during stimulation. (a) Example of a standard pattern. Top: TFR obtained by wavelet transformation of the signal in response to stimulation with ester E05 (ethyl pentanoate). The vertical red bar indicates the onset of the stimulation and corresponds to time zero. The y -axis runs from 5 to 100 Hz. The standard pattern shows alternating epochs of oscillations in the beta and gamma bands. Energy is color coded: blue, low energy; red, high energy. Bottom: upper trace, raw signal. A diamond background indicates a gamma oscillation, whereas a striped background indicates a beta oscillation. Lower trace: respiration. Shaded and white areas correspond to inspiration and expiration phases, respectively. (b) Example of a gammaless pattern. TFR obtained by wavelet transformation of the signal in response to stimulation with alcohol A06 (hexanol). Note that the gammaless pattern shows strong bursts of oscillations in the beta band only. Same codes as in (a). Bottom: same legend as in (a).

P -value $\ll 0.0001$; Fig. 5b and c). Furthermore, a major difference appears between the two families: odds values for alcohols are always ≤ 1 , whereas odds values for esters are always ≥ 1 (Fig. 5b and c). This means that alcohols have a high probability of evoking the gammaless pattern, whereas esters have a high probability of triggering the standard pattern. Taken together these results indicate that, for the same F , SVp determines the probability of gamma occurrence. This relation is no longer true for molecules with different F s.

To illustrate the discontinuities between odds values and SVp values when odors belong to different families, we chose two examples. In Fig. 6a, odors (E07 vs. A06) elicit patterns of oscillations far more different than would be predicted from their close SVp values (124 and 91 Pa, respectively). The odds values for these two odors indicate that patterns would be quite dissimilar (odds values, A06 = 0.83, E07 = 1.78). The opposite case is illustrated in Fig. 6b. Despite having very dissimilar SVps (6 and 293 Pa), these two odors (E10 and A05, respectively) elicit very similar LFP patterns that are confirmed by their close odds values (E10 = 0.90; A05 = 1.04).

In conclusion, it seems that odor quality determines a range of possible odds values and that the SVp of the odor sets the definitive odds value of the odor.

Discussion

As previously described (Buonviso *et al.*, 2003), we observed that odors elicit oscillations in the LFPs that can be strictly separated in two categories based on several characteristics. The designation of these oscillations is based on their frequency, and thus we defined two bands designated as beta and gamma. We show here that bursts of oscillations could be separated effectively on the basis of their duration or respiratory phase. Statistical analysis revealed that odor has little influence over the intrinsic characteristics of the oscillations. With the exception of the respiratory phase of beta oscillations, oscillations remain constant regardless of odor identity. Conversely, odor identity has a strong influence on the temporal patterning of LFP oscillatory activity. Moreover, for molecules of the same chemical family, the probability of gamma occurrence is greatly correlated to

Carbon Chain Length

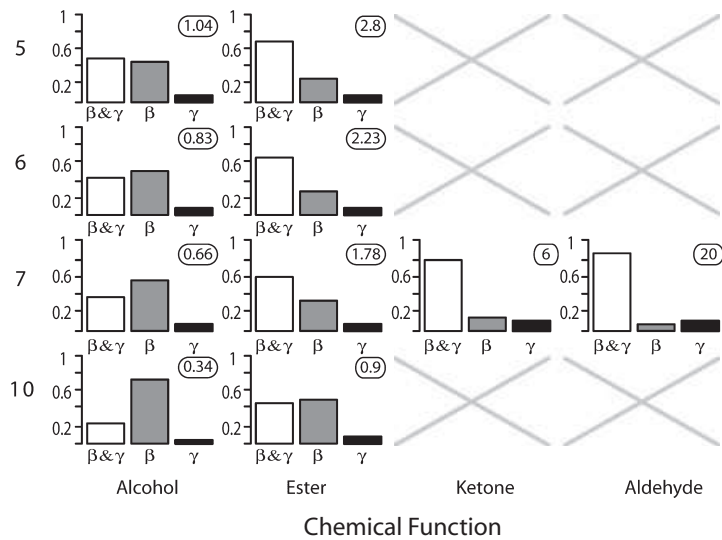


FIG. 4. Odor quality determines the temporal patterning of bulbar oscillations. Probability histograms for three patterns of oscillations: standard (beta and gamma, unfilled bars), gammaless (beta, grey bars) and betaless (gamma, black bars). The vertical scale indicates the probability of a pattern occurrence. All results presented here come from the model constructed from our experimental data. Histograms are ordered as a function of both L of the odor molecules (rows: from bottom to top 10, 7, 6 and 5 carbons) and molecular F (columns: A, E, K and D). The odds value associated with each molecule is indicated at the upper right corners.

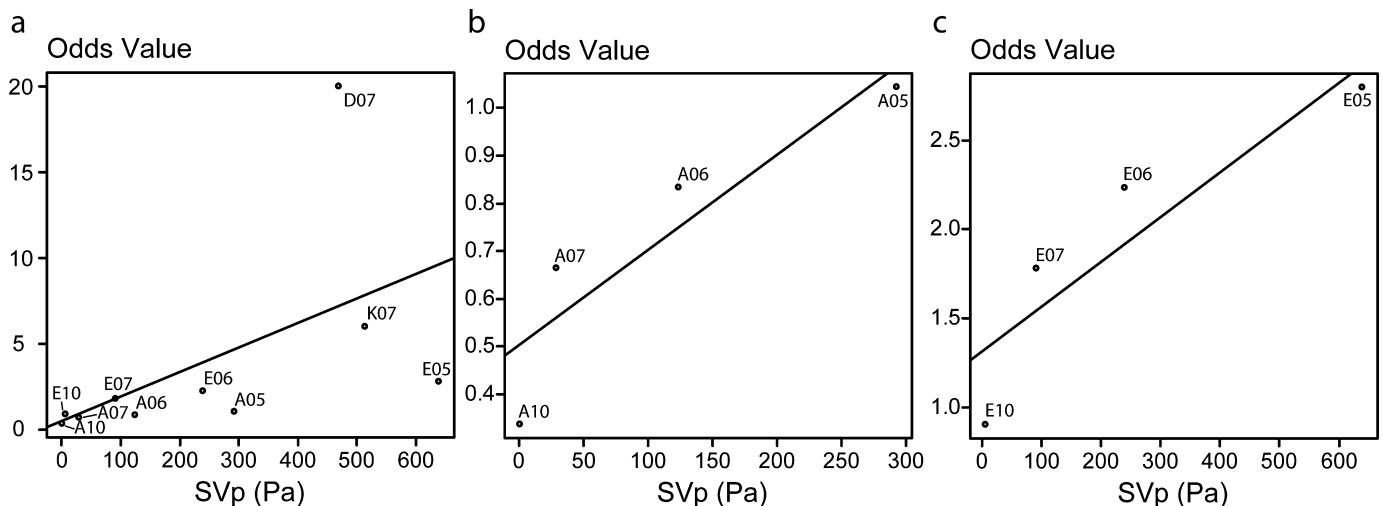


FIG. 5. Correlation between SVp and odds values. The SVp values were estimated with the EPI v3.11 (Estimation Programs Interface) software suite developed by the US Environmental Protection Agency's Office of Pollution Prevention Toxics and Syracuse Research Corporation. (a) Correlation for all odors used in the stimulation protocol, with first-degree best polynomial fit of equation $f(x) = 0.01436x + 0.46561$. Correlations within alcohol (b) and ester (c) chemical families, with first-degree best polynomial fit of equations $f(x) = 0.001998x + 0.501441$ and $f(x) = 0.002516x + 1.314804$, respectively.

odor vapor pressure. This correlation is not so strong for odors with different F s.

Determination of temporal patterning by odorant features

Each molecule has the ability to elicit both standard patterns, which are characterized by alternating bursts in the gamma and beta bands, and gammaless patterns, which are characterized by beta oscillations alone, with different probabilities. The ratio between these two probabilities has been defined as an odor's odds value. For odors with a similar F (homologous series of alcohols or esters), odds values are correlated with the L of the molecule. For the same F , the longer the odor's carbon chain, the lower its SVp (volatility) and the lower its probability to evoke oscillations in the gamma range. As suggested by the recent work of Lowry & Kay (2007), SVp is a good estimator of

the airborne concentration of the odor. In such conditions, we may assume that odds values within a chemical family are determined by the airborne concentration of the molecules. However, our data show that the correlation between odds values and SVp is greatly enhanced when odors belong to the same chemical family (see Fig. 5). Within two chemical families (alcohol and ester), the relationship between SVp and odds value is nearly linear and thus very comparable. A notable difference in these relationships lies in the fact that the overall odds value for alcohols is below 1, whereas the overall odds value for esters is above 1. This suggests that the chemical family determines a range of possible odds values and that the vapor pressure of the odor will set the definitive odds value of the odor in particular conditions. By setting the range in which the odds value will vary, the chemical family categorizes the odor at a very early stage of olfactory information processing.

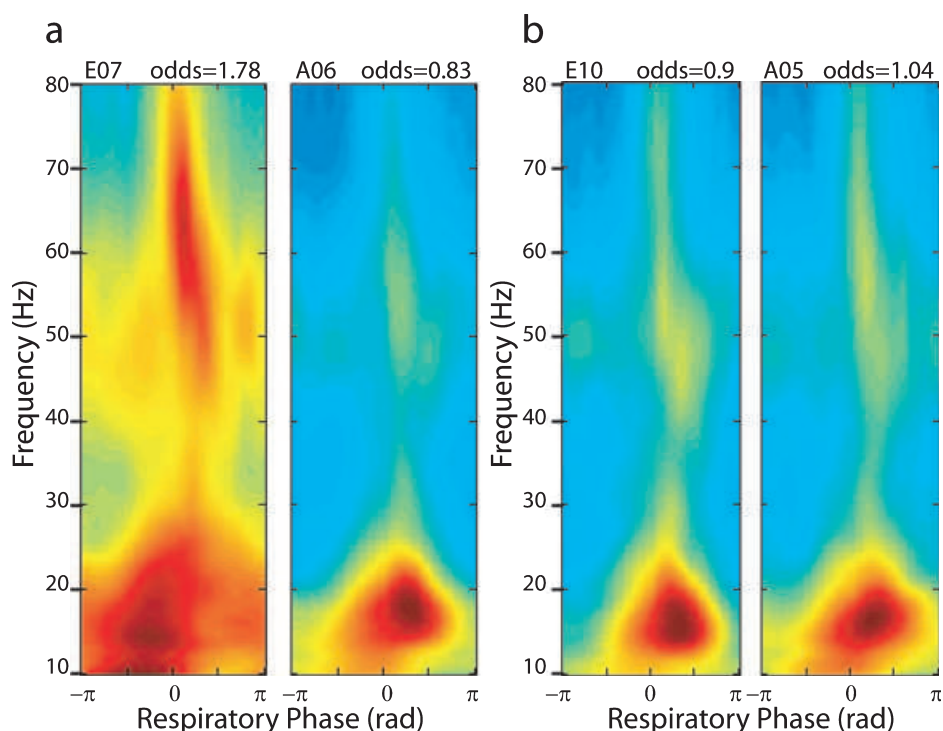


FIG. 6. Patterns of oscillations evoked by two pairs of odors. Phase–frequency representations of odor-evoked LFP patterns. All respiratory cycles from the stimulation epoch are averaged. Energy is color-coded: blue, low energy; red, high energy. Odds values are indicated at upper right corners. SVp values are as follows: E07, 91 Pa; A06, 124 Pa; E10, 6 Pa; A05, 293 Pa. (a) Two odors with dissimilar odds values induce dissimilar LFP patterns. E07 (left) evokes high energy in the gamma band with a negative beta respiratory phase. In contrast, A06 (right) evokes mainly beta oscillations with a positive respiratory phase. (b) Two odors with close odds values induce very similar LFP patterns, with little energy in the gamma band and a positive respiratory phase for beta oscillations.

Significance of different oscillatory frequency ranges

We observed that gamma oscillations, when they exist, occur with the same respiratory phase around the transition between inspiration and expiration. This phase corresponds to the moment of maximal amplitude on an electro-olfactogram (Chaput, 2000), which is probably also the time of maximal neuroreceptor activation. This observation led us to the hypothesis that gamma occurrence could be related to the time of maximal concentration in the olfactory epithelium, implying therefore that gamma oscillations would reflect a high afferent input excitation. The observation that beta waves occur mainly during expiratory epochs when the concentration of the odorant molecule is lower in the olfactory epithelium supports this assumption. This interpretation is in agreement with the report of Neville & Haberly (2003) that odors at high concentrations induced prominent gamma frequency oscillations, whereas those at lower concentrations elicited beta oscillations. However, in waking animals, high power in the beta spectrum is obtained in response to highly volatile odors (Lowry & Kay, 2007). This discrepancy might be explained by the sniffing behavior of the animal, which could produce a different influx of molecules into the nasal cavity.

We observed in our study that aliphatic alcohols mostly elicited LFP patterns characterized by a lack of gamma oscillations. According to the preceding discussion, the assumption can be made that odors inducing gammaless patterns are composed of molecules that poorly activate the olfactory epithelium. Such a poor activation may originate from different circumstances, e.g. (i) low airborne concentration of the odor in the nasal cavity (possibly linked to a low SVp); (ii) low number of receptor neurons tuned to the odor; (iii) difficult access to the receptor site; or (iv) low solubility and/or high hydrophobicity. This hypothesis finds support in a recent report

showing that electro-olfactogram response modulation by sniff rate and decay time varies with molecular odorant features (Scott *et al.*, 2006).

Functional relevance

Our results can be compared with those from the optical imaging of intrinsic signals obtained by Uchida *et al.* (2000). Indeed, these authors report that odor receptors possessing a common molecular-feature receptive site are grouped together and represented by glomeruli that are localized in topographically fixed domains in the OB. Various structural features differentially influence the spatial map of activated glomeruli. The F has been designated as the ‘primary feature’ of the molecule and the L has been designated as a ‘secondary feature.’ The former characterizes a domain of activated glomeruli in the spatial map and the latter represents the local arrangement of activated glomeruli within the domain. Moreover, a domain exhibits a polarity such that a systematic and gradual shift of the positions of activated glomeruli occurs with an increase in the L of odors. Thus, a parallel can be drawn as follows: the ‘primary feature’, or F, determines both the domain in glomerular maps and the odds value range in our data. The ‘secondary feature’, or L, determines the local position in the glomerular map and the evolution of odds values within the range determined by the chemical family. This last statement is in agreement with our observation that a relationship exists between odds value and SVp within a chemical family. The concept could be refined by introducing supplemental features, each of which describes a molecular property. It is the sum of all features that will ultimately determine the elicited pattern of oscillations.

From a functional point of view, it is plausible that the molecular features of the odors (steric size, solubility, number of double bonds, etc.) define the pattern of neuroreceptor activation. Peripheral activation can be assumed to evoke an odor-specific glomerular spatial map that is converted into an odor-specific spatio-temporal map of oscillatory LFP activity. The exact role that the LFP may play in information coding is as yet unknown but several studies suggest that the LFP reflects synaptic, rather than spiking, activity. Thus, LFPs could provide a temporal frame, underlying and pacing the spiking activity, that would vary with olfactory stimulus characteristics. The importance of LFPs lies in the possibility that they may structure the time dimension of bulbar output. Therefore, temporal structuring of bulbar output might reflect the molecular features of an odor, including both its chemical family and its more precise identity within the family. This view is supported by the report from Friedrich *et al.* (2004), which reveals a simultaneous conveyance of both odor category and identity by the same population of zebrafish bulbar neurons, a multiplexing strategy based on a double time-scale reading. The temporal frame provided by LFP oscillations may be involved in a similar strategy in the rat OB.

Acknowledgements

The authors wish to thank Thierry Thomas-Danguin (INRA, Dijon) for his helpful advice on chemical aspects, Brett A. Johnson (University of California) for fruitful discussions and John W. Scott (Emory University, Atlanta, GA, USA) for careful reading of the manuscript.

Abbreviations

F, functional group; L, carbon-chain length; LFP, local field potential; OB, olfactory bulb; SVp, saturation vapor pressure.

References

- Belluscio, L. & Katz, L.C. (2001) Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *J. Neurosci.*, **21**, 2113–2122.
- Buck, L. & Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**, 175–187.
- Buonviso, N. & Chaput, M.A. (1990) Response similarity to odors in olfactory bulb output cells presumed to be connected to the same glomerulus: electrophysiological study using simultaneous single-unit recordings. *J. Neurophysiol.*, **63**, 447–454.
- Buonviso, N., Chaput, M.A. & Berthommier, F. (1992) Temporal pattern analyses in pairs of neighboring mitral cells. *J. Neurophysiol.*, **68**, 417–424.
- Buonviso, N., Amat, C., Litaudon, P., Roux, S., Royet, J., Farget, V. & Sicard, G. (2003) Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 1811–1819.
- Buonviso, N., Amat, C. & Litaudon, P. (2006) Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. *Chem. Senses*, **31**, 145–154.
- Chaput, M.A. (2000) EOG responses in anesthetized freely breathing rats. *Chem. Senses*, **25**, 695–701.
- Friedrich, R.W. & Laurent, G. (2001) Dynamic optimization of odor representations by slow temporal patterning of mitral cell activity. *Science*, **291**, 889–894.
- Friedrich, R.W., Habermann, C.J. & Laurent, G. (2004) Multiplexing using synchrony in the zebrafish olfactory bulb. *Nat. Neurosci.*, **7**, 862–871.
- Halle, E.A. & Carlson, J.R. (2006) Coding of odors by a receptor repertoire. *Cell*, **125**, 143–160.
- Hartigan, J.A. & Wong, M.A. (1979) A K-means clustering algorithm. *Appl. Stat.*, **28**, 100–108.
- Imamura, K., Mataga, N. & Mori, K. (1992) Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. I. Aliphatic compounds. *J. Neurophysiol.*, **68**, 1986–2002.
- Johnson, B.A., Woo, C.C. & Leon, M. (1998) Spatial coding of odorant features in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, **393**, 457–471.
- 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 odors. *Brain Res.*, **188**, 139–154.
- Katoh, K., Koshimoto, H., Tani, A. & Mori, K. (1993) Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. II. Aromatic compounds. *J. Neurophysiol.*, **70**, 2161–2175.
- Kronland-Martinet, R., Morlet, J. & Grossman, A. (1988) Analysis of sound patterns through wavelet transforms. *Int. J. Patt. Rec. Art. Intell.*, **1** (2), 273–301.
- Long, J.S. (1997) *Regression Models for Categorical and Limited Dependent Variables (Advanced Quantitative Techniques in the Social Sciences)*. Sage Publications, Thousand Oaks, CA.
- Lowry, C.A. & Kay, L.M. (2007) Chemical factors determine olfactory system beta oscillations in waking rats. *J. Neurophysiol.*, **98**, 394–404.
- Mallat, S. (1989) A theory for multiresolution signal decomposition: the wavelet representation. *IEEE Trans. Patt. Anal. Mach. Intell.*, **11**, 674–693.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. & Buck, L.B. (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, **96**, 713–723.
- Martin, C., Gervais, R., Hugues, E., Messaoudi, B. & Ravel, N. (2004) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *J. Neurosci.*, **24**, 389–397.
- Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. & Axel, R. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, **87**, 675–686.
- Mori, K., Kishi, K. & Ojima, H. (1983) Distribution of dendrites of mitral, displaced mitral, tufted, and granule cells in the rabbit olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, **219**, 339–355.
- Mori, K., Mataga, N. & Imamura, K. (1992) Differential specificities of single mitral cells in rabbit olfactory bulb for a homologous series of fatty acid odor molecules. *J. Neurophysiol.*, **67**, 786–789.
- Mori, K., Takahashi, Y.K., Igarashi, K.M. & Yamaguchi, M. (2006) Maps of odorant molecular features in the mammalian olfactory bulb. *Physiol. Rev.*, **86**, 409–433.
- Neville, K.R. & Haberly, L.B. (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J. Neurophysiol.*, **90**, 3921–3930.
- 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.
- Roux, S.G., Garcia, S., Bertrand, B., Cenier, T., Vigouroux, M., Buonviso, N. & Litaudon, P. (2006) Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. *J. Neurosci. Meth.*, **152**, 173–178.
- Roux, S.G., Cenier, T., Garcia, S., Litaudon, P. & Buonviso, N. (2007) A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal. *J. Neurosci. Meth.*, **160**, 135–143.
- Rubin, B.D. & Katz, L.C. (1999) Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron*, **23**, 499–511.
- Scott, J.W., Acevedo, H.P. & Sherrill, L. (2006) Effects of concentration and sniff flow rate on the rat electroolfactogram. *Chem. Senses*, **31**, 581–593.
- Shepherd, G.M. & Greer, C.A. (1998) Olfactory bulb. In Shepherd, G.M. (Ed.), *The Synaptic Organization of the Brain*. Oxford UP, NY, pp. 159–203.
- Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B.H. & Laurent, G. (1997) Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature*, **390**, 70–74.
- Uchida, N., Takahashi, Y.K., Tanifuji, M. & Mori, K. (2000) Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nat. Neurosci.*, **3**, 1035–1043.
- Vassar, R., Chao, S.K., Sitcheran, R., Nuñez, J.M., Vosshall, L.B. & Axel, R. (1994) Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*, **79**, 981–991.
- Vialatte, F.B., Martin, C., Dubois, R., Haddad, J., Quenet, B., Gervais, R. & Dreyfus, G. (2007) A machine learning approach to the analysis of time-frequency maps, and its application to neural dynamics. *Neural Netw.*, **20**, 194–209.
- Wehr, M. & Laurent, G. (1996) Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature*, **384**, 162–166.
- Willhite, D.C., Nguyen, K.T., Masurkar, A.V., Greer, C.A., Shepherd, G.M. & Chen, W.R. (2006) Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 12 592–12 597.
- Zhao, H., Ivic, L., Otaki, J.M., Hashimoto, M., Mikoshiba, K. & Firestein, S. (1998) Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science*, **279**, 237–242.

2.2 Deuxième étude

FORMATION D'ASSEMBLÉES DE NEURONES GAMMA ET BÉTA SOUS CONTRÔLE DE LA RESPIRATION DANS LE BULBE OLFACTIF DU MAMMIFÈRE.

Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb.

Tristan Cenier, François David, Philippe Litaudon, Samuel Garcia, Corine Amat et Nathalie Buonviso.

Publié dans *European Journal of Neuroscience*, accepté le 7 janvier 2009.

UN NOMBRE CROISSANT D'ÉTUDES suggère que la représentation de l'information repose non seulement sur la variation du taux de décharge des neurones mais également sur la variation de la position des potentiels d'action par rapport à la référence temporelle que constituent les oscillations des potentiels de champ locaux (LFP). Dans le bulbe olfactif du rat anesthésié et respirant librement, la stimulation olfactive évoque des oscillations dans deux bandes de fréquence distinctes, les bandes bêta (10–35 Hz) et gamma (40–80 Hz), de manière alternée par rapport au cycle respiratoire de l'animal. Conjointement, les deutoneurones émettent des potentiels d'action en suivant une organisation temporelle relative au décours du cycle respiratoire. À partir d'enregistrements simultanés des LFP et de l'activité unitaire des deutoneurones, nous avons analysé les liens temporels existant entre activité oscillatoire et activité unitaire et avons montré que ces deux activités sont cohérentes à plus d'un niveau et que l'activité respiratoire participe à l'organisation temporelle des phénomènes dynamiques bulbaires.

Nous avons classé les cellules enregistrées en deux catégories, en fonction de l'organisation temporelle de leur décharge, par rapport au cycle respiratoire. La catégorie S+ correspond aux activités de type excitatrice, c'est à dire une augmentation ponctuelle de la fréquence d'émission de potentiels d'action. , la catégorie S- désigne les activités inhibitrices, c'est à dire présentant une diminution ponctuelle de la fréquence de décharge. Nous avons montré que la phase moyenne par rapport au cycle respiratoire des activités S+ et S- correspond à la phase moyenne d'apparition des oscillations dans les bandes gamma et bêta, respectivement. Nous avons montré que la fréquence d'émission de potentiels d'action dans les activités S+ et S- se situent dans la même gamme que les oscillations gamma et bêta des LFP, respectivement. Enfin, nous avons montré que les potentiels d'action des activités S+ et S- sont synchronisées sur les oscillations des LFP dans les bandes gamma et bêta respectivement, et uniquement dans ces bandes. Nous avons donc montré que la cohérence entre oscillations des LFP dans les bandes gamma et bêta et l'ac-

tivité unitaire des activités S+ et S-, respectivement, s'établissait à trois niveaux : au niveau respiratoire (coïncidence des phases respiratoire d'activité maximale), au niveau fréquentiel (cohésion des fréquences d'activité) et au niveau de la synchronisation (cohérence de phase entre oscillations et évènements unitaires).

Nous suggérons que l'alternance du niveau d'intensité afférente au bulbe olfactif imposée par le cycle respiratoire oriente l'activité du réseau bulbaire vers deux régimes de fonctionnement différents et alternés. En régime de forte activation, les cellules présentant une activité S+ vont émettre des potentiels d'action synchronisés sur les oscillations gamma. En régime d'activation modérée, les cellules présentant une activité S- vont émettre des potentiels d'action synchronisés avec les oscillations bêta. L'existence de ces deux régimes résulte de l'alternance entre inspiration et expiration et aboutit à la formation de deux assemblées de neurones distinctes, apparaissant de façon alternée au cours du cycle respiratoire. Nous faisons l'hypothèse que les assemblées de neurones formées pendant le régime gamma pourraient être impliquées dans le transfert de l'information vers le cortex piriforme, tandis que les assemblées de neurones formées pendant le régime bêta pourraient refléter des phases de dialogue entre le bulbe et les centres supérieurs, organisant et raffinant l'activité bulbaire.

NEUROSYSTEMS

Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb

Tristan Cenier, François David, Philippe Litaudon, Samuel Garcia, Corine Amat and Nathalie Buonviso
Neurosciences Sensorielles, Comportement, Cognition, Université Claude Bernard Lyon1, CNRS UMR 5020, Institut Fédératif de Neurosciences de Lyon, 50, avenue Tony Garnier, 69366 Lyon cedex 7, France

Keywords: breathing, LFP, mitral cells, oscillations, rat

Abstract

A growing body of data suggests that information coding can be achieved not only by varying neuronal firing rate, but also by varying spike timing relative to network oscillations. In the olfactory bulb (OB) of a freely breathing anaesthetized mammal, odorant stimulation induces prominent oscillatory local field potential (LFP) activity in the beta (10–35 Hz) and gamma (40–80 Hz) ranges, which alternate during a respiratory cycle. At the same time, mitral/tufted (M/T) cells display respiration-modulated spiking patterns. Using simultaneous recordings of M/T unitary activities and LFP activity, we conducted an analysis of the temporal relationships between M/T cell spiking activity and both OB beta and gamma oscillations. We observed that M/T cells display a respiratory pattern that pre-tunes instantaneous frequencies to a gamma or beta regime. Consequently, M/T cell spikes become phase-locked to either gamma or beta LFP oscillations according to their frequency range and respiratory pattern. Our results suggest that slow respiratory dynamics pre-tune M/T cells to a preferential fast rhythm (beta or gamma) such that a spike–LFP coupling might occur when units and oscillation frequencies are in a compatible range. This double-coupling process might define two complementary beta- and gamma-neuronal assemblies along the course of a respiratory cycle.

Introduction

Traditional studies on information coding have been carried out independently on either unitary or electroencephalogram (EEG) activity. The current trend is to consider a more complete view of brain functioning by focusing on the temporal relationships between the activity of individual cells and the activity of a population as captured by local field potential (LFP) or EEG signals. Indeed, although the ‘single-neuron doctrine’ emphasized the role of individual neuron activation (Sherrington, 1906; Cajal, 1911), new hypotheses have emerged that posit that neuronal representations of stimuli consist of assemblies of cooperating neurons (for review, see Engel *et al.*, 1999) that interact and fire synchronously. Periods of coherent cellular activity during LFP oscillatory epochs have been associated with functional states such as sensory, cognitive or behavioural tasks. For example, during a working memory task with strabismic kittens, the clues indicating which signals are perceived are not the unitary response rate but rather the degree of synchronicity of unit discharges in areas 17 and 18 during LFP gamma frequency oscillatory epochs (Fries *et al.*, 1997).

Information coding by dynamic assemblies has been well studied in the locust olfactory system. The main findings were that individual neurons of the antennal lobes synchronize with different neurons at different epochs of an oscillatory population response, and that the

oscillatory synchronization pattern is odour-specific (Laurent & Davidowitz, 1994; Laurent *et al.*, 1996). Pharmacological desynchronization in honeybees impaired fine discrimination in a behavioural paradigm (Stopfer *et al.*, 1997), demonstrating the functional relevance of oscillatory synchronization. In the fish olfactory bulb (OB), in contrast, only small fractions of cells have been found to fire spikes locked in phase to the oscillation (Friedrich *et al.*, 2004). When phase-locked spikes convey information about odour category, residual spikes convey information about precise odour identity. In mammals, most data come from *in vitro* recordings in OB slices, where electrically induced LFP oscillations occur only in the gamma range (Lagier *et al.*, 2004). The very few *in vivo* studies with mammals (Eeckman & Freeman, 1990; Kashiwadani *et al.*, 1999) have revealed that mitral/tufted (M/T) cell spikes tend to phase-lock on the oscillatory LFP. Nevertheless, LFPs are described as oscillating in a single frequency range. Conversely, in rats, LFP activity displays oscillations alternatively in both the beta and gamma bands during a respiratory cycle (Buonviso *et al.*, 2003; Cenier *et al.*, 2008). Thus, it might be interesting to reexamine the notion of the temporal relationship between population oscillatory phenomena and single neuron activity.

In this study, we simultaneously recorded LFP and M/T unit discharges in the OB of freely breathing anaesthetized rats. We investigated the extent to which LFP and M/T cells spiking activities could be phase-locked. We found that M/T cells present patterns of activity that are mainly determined by respiratory dynamics. We showed that such respiratory dynamics pre-tune M/T cells to a range

Correspondence: Dr T. Cenier, as above.
E-mail: tcenier@olfac.univ-lyon1.fr

Received 9 October 2008, revised 22 December 2008, accepted 7 January 2009

of firing frequencies and this will determine which spikes become phase-locked either with gamma or beta oscillations. Hence, gamma- or beta-assemblies of cooperating neurons alternatively appear during the respiratory cycle.

Materials and methods

Preparation and recording

Male Wistar rats (150–350 g) obtained from Charles River Labs (L'Arbresle, France) were anaesthetized with urethane (1.5 mg/kg, i.p., with additional supplements as needed) and placed in a stereotaxic apparatus. LFP oscillations were used to monitor anaesthesia depth. Animals were placed on a heating pad to maintain constant body temperature. All experiments were done in strict accordance with the European Communities Council guidelines, and approved by the Ethics Committee of the Université de Lyon 1.

The surgical procedure consisted of removing a bone window and exposing the dorsal region of the OB. Bulbar activity was recorded as a broadband signal (0.1–5 kHz) using 16-channel silicon probes (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI, USA) with a homemade 16-channel DC amplifier. Data were digitally sampled at 10 kHz and acquired on a PC using a 16-channels IOtech acquisition system (Wavebook, IOtech, Cleveland, OH, USA). Out of the 16 channels on a probe, 14 only were used, in order to free up two channels on the acquisition device for respiratory signal and stimulus onset/offset markers. Probes were placed in the lateral or medial part of the OB at such a depth that the maximum number of channels could be located within, or close to, the mitral cell layer. The position of the probe was mainly determined by the magnitude of unit action potentials, the inability to record spikes from the granule cell layer and mainly LFP waveform, which is characteristic for each OB layer, as demonstrated in Buonviso *et al.* (2003). We also relied on our previous characterization of the general firing patterns of the different bulbar cell subpopulations to discard from analysis external tufted cell activities and include only mitral, middle and deep tufted cells. Recordings were performed in the entire antero-posterior axis of the OB.

Respiration was monitored with a homemade device described by Roux *et al.* (2006) and placed at the entrance of the nostril. This device functioned as a bidirectional airflow sensor such that respiratory airflow changes were measured as a depression during inhalation and a super-pressure during exhalation. Recordings were performed in 15-s-long sweeps. Odours were simple aliphatic compounds, varying in features such as the number of carbons in the main chain (chain length: 5, 6, 7 and 10 C) or the functional group associated with the chain (alcohol, ester, aldehyde or ketone). Additional odours were used, such as isoamyl acetate, p-cymene or eugenol. We chose to stimulate animals with several identities and categories of odours in order to increase the probability of cell responses. The recording session consisted of as many sweeps as there were odours in our panel (between 10 and 12 odours), in an order determined randomly for each session. Odours were delivered in front of the animal's nose, at 18% of the saturated vapour pressure, through a dilution olfactometer (400 mL/min) continuously for 5 s. Recording sweeps therefore consist of 5 s of pre-stimulus activity, 5 s of odour-evoked activity and 5 s of post-stimulus (or odour-washout) activity (at an early stage of the setup, however, the period of spontaneous activity was 10 s long, later adjusted to 5 s to reduce the size of files). Ninety seconds separated two consecutive sweeps. After all odours were delivered once, the probe was relocated and a whole recording session could

start again. On average, 1.9 recording sessions per animal were performed.

Data processing

Using the respiratory signal as a time basis for electrophysiological signals

An important feature of the olfactory signal is its temporal correlation with breathing. Therefore, we developed a method to represent data as a function of the respiratory phase (Roux *et al.*, 2006). Briefly, the recorded respiratory signal was processed to extract each respiratory epoch. The time component of these periods was then converted into a phase component defined as $[-\pi, 0]$ and $[0, \pi]$ for inspiration and expiration, respectively. As a result, electrophysiological signals were no longer represented as a function of time, but as a function of respiratory phase. The main advantage of this method is that the phase representation, as opposed to time representation, is common to all trials. Electrophysiological recordings were analysed relative to the transition points between inhalation and exhalation (I/E), which can be automatically detected as 0-crossings of the respiratory signal. These points correspond to moments of null airflow during the rising phase.

LFPs

Wavelet transform. LFPs were obtained by band-passing the recorded signal at 5–200 Hz. On average, 10 ± 4 out of 14 channels provided exploitable LFP recordings. In order to preserve both time and frequency information, we used a time–frequency representation (TFR) based on a continuous wavelet transform; the method is described in detail by Roux *et al.* (2007). Briefly, the down-sampled LFP signal was convoluted with Morlet's complex wavelets (Kronland-Martinet *et al.*, 1987). Morlet's wavelets stretch from 0 to 100 Hz, with a 1-Hz resolution in the frequency domain and a 5-ms resolution in the temporal domain. All programs and routines were written and implemented in Matlab (MathWorks) and Python. To compare the temporal aspects of several TFRs, the raw signal was resampled to fit the linearized respiratory cycle. Therefore, the time–frequency maps were converted from this resampled signal into phase–frequency representations (Roux *et al.*, 2006).

Wavelet ridge extraction. The main goal of this study was to analyse the correlations between spikes, fast transitory phenomena that occur at high frequencies, and LFP, which are low-frequency phenomena. Previously we developed an algorithm (Roux *et al.*, 2007) to extract phase information from the oscillations identified in the signal. Briefly, for each frequency band of interest, we computed the mean and standard deviation (SD) of the time–frequency map and defined the threshold as the $(\text{mean} \pm 5 \text{ SD})$ of the time–frequency energy contained in the pre-stimulus period (between 0 and 5 s). These thresholds were used to define time and frequency boxes centred on points of maximum energy in the signal, bounded by small time and frequency ranges. Finally, we ran a high-resolution Morlet's complex wavelet transformation on each box. This identified the instantaneous signal phase and frequency data during each oscillatory epoch.

Spikes

Spike sorting. Signals from individual electrodes were amplified (gain $1000 \times$) and filtered from 300 to 5000 Hz. Multi-unit activity consisted of a few neurons on each electrode (on average, 3 ± 2 electrodes out of 14 picked up exploitable multi-unit activity). We tried several spike-sorting algorithms based on *k*-means or indepen-

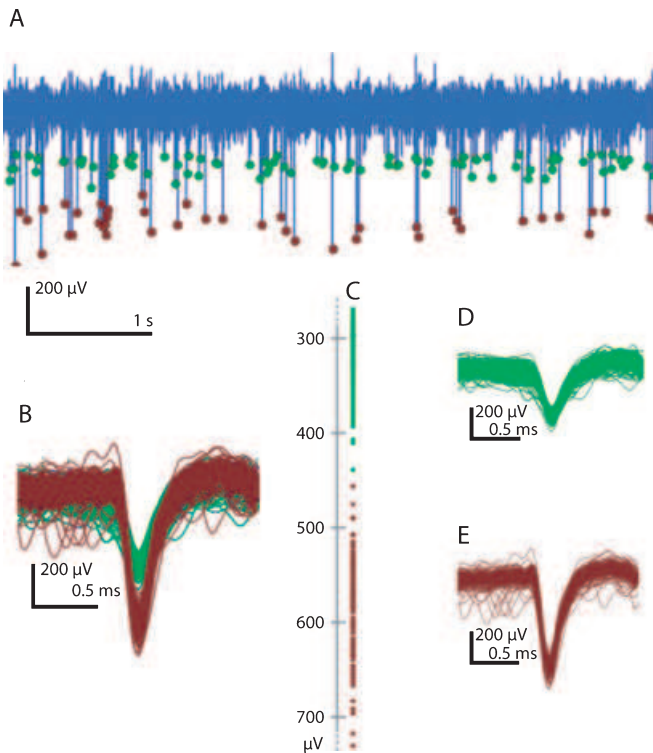


FIG. 1. Example of spike clustering. (A) Five seconds of raw data from one electrode, during odor stimulation with 2-n-heptanal, filtered at 300–3000 Hz. Dots indicate the spikes that were automatically detected, the different colors indicating the amplitude threshold set manually after detection. (B) Spike waveforms from the whole recording (15 s), divided into two clusters (high and low threshold) with shading corresponding to the dots in (A). In (C) individual spike amplitude projections confirm the validity of the threshold. (D and E) Spike waveforms for the two separated clusters ($n = 220$ and 146, respectively).

dent component analysis. None proved reliable, however, and failure of automatic sorting methods could be due to the type of electrode and the sampling frequency (10 kHz) used and the small number of spikes in a sweep. Therefore, we decided for an offline spike clustering, using a semi-automated routine. First, spikes were detected automatically, provided a time interval of at least 4 ms existed between two consecutive spikes. Then clusters were determined manually, based only on spike amplitude. Signal to noise ratio was commonly about 5/1 and never lower than 3/1. Figure 1 shows an example of odour-evoked multi-unit activity (Fig. 1A) where spikes were automatically detected then manually separated into two clusters. Average spike form and amplitude projection confirms the validity of the clustering (Fig. 1B). We sorted a total of 1169 clusters, 70% of which were the only selected clusters on the sweep, 28% were selected from a sweep conjointly with a second cluster, the remaining 2% are cases where three clean clusters could be non-ambiguously separated on the sweep. The procedure was severe and resulted in a limited number of exploitable units, but with guaranteed reliability.

Spiking rhythm. To assess the presence of cellular rhythms, researchers typically use autocorrelation histograms. Such analyses were not appropriate for our study because each unit was recorded in a single trial in order to prevent adaptation processes. This resulted in a small number of recorded spikes per unit, which did not enable us to perform autocorrelation analyses. In order to overcome this issue, we chose to analyse data from the population as a whole. Because

autocorrelation analyses cannot be performed on a population due to the probable different rhythm in each cell, we chose to use averaged interspike interval (ISI) histograms and to analyse the percentage of occurrence of each interval duration. We focused on interval ranges corresponding to gamma (40–80 Hz) and beta (15–30 Hz) ranges (i.e. 12–25 and 33–66 ms, respectively). ISI histograms are normalized to the total number of spikes, so that the y -axis represents the percentage of events in each bin, enabling comparison between populations or epochs with different sizes.

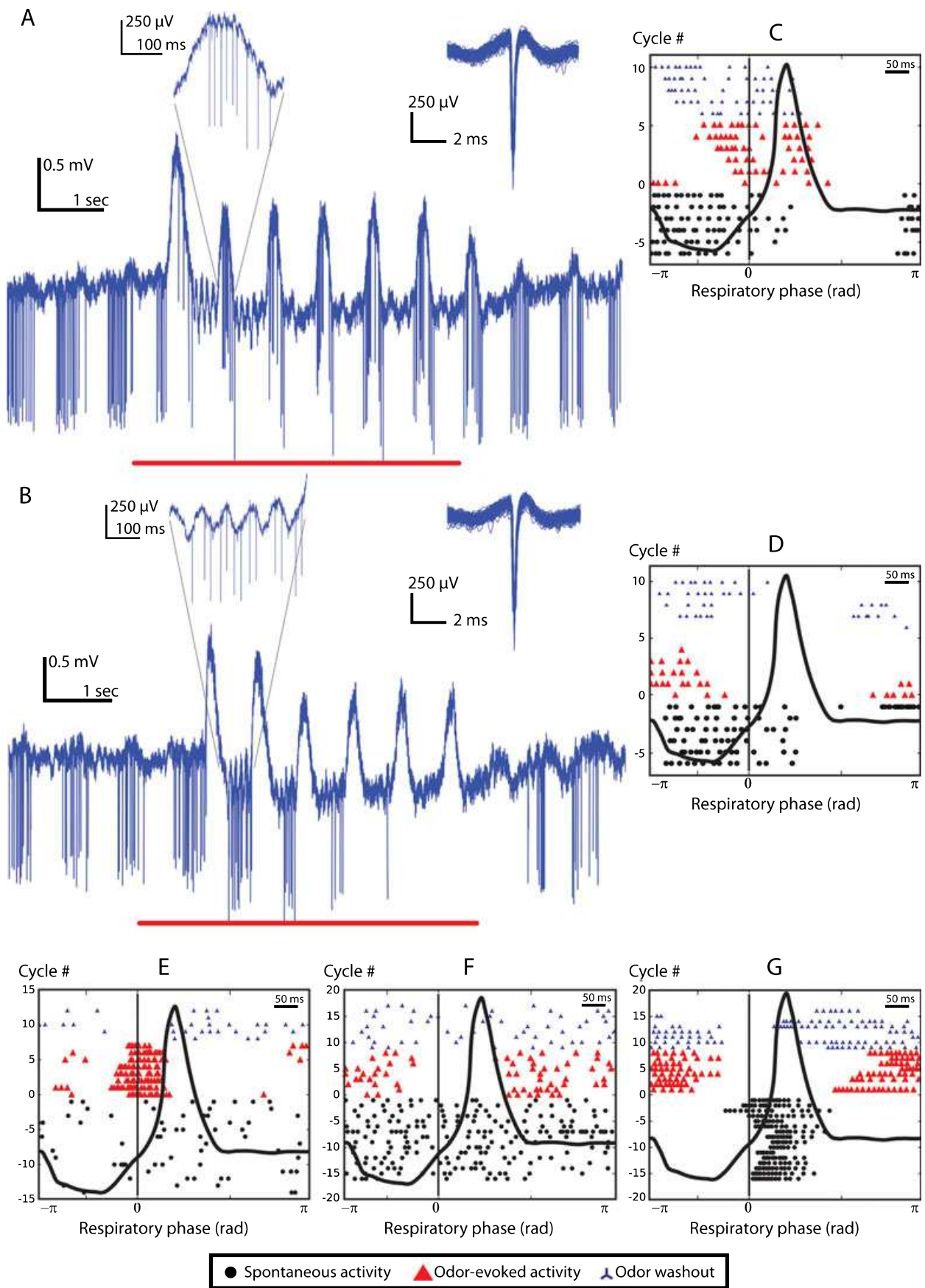
Occasionally, we needed to measure the firing rate per oscillatory burst. This was achieved by averaging all ISI values between the first and last spike during an oscillation burst, bounded by the high-resolution wavelet transform box as defined in the preceding section.

Respiratory patterns. As previously described (Chaput *et al.*, 1992), M/T cell activity is well characterized as a function of its temporal pattern along the respiratory cycle. To evaluate such patterns, we used a sliding window along the respiratory cycle to calculate the instantaneous spiking frequency for each bin. Both the number of bins per cycle (20) and the width of the bins (50 ms) were fixed parameters, each bin being partially overlapped by the next one. The width of overlapping was an elastic parameter, determined by the duration of the respiratory cycle to compensate for the variability in respiratory frequency. These data were used to construct respiratory cycle-triggered histograms. Based on the description of Chaput *et al.* (1992), histograms were classified into different types. For the present study, we reduced this classification to four types: (i) unsynchronized patterns, characterized by a uniform distribution of spiking activity along the respiratory cycle; (ii) excitatory-simple-synchronized patterns (S+), presenting a single increase in firing activity synchronized with the respiratory cycle; (iii) suppressive-simple-synchronized patterns (S−), presenting a single decrease or stop in firing activity synchronized with the respiratory cycle; and (iv) complex-synchronized patterns, exhibiting multiple firing frequency changes along the respiratory cycle. Pattern classification was performed by visual inspection, first independently and then all together by three different observers. Patterns were selected for further analysis only if they were given the same type by at least two observers out of three. Other patterns were discarded.

Spike-LFP phase coupling. Our wavelet ridge-based analysis method of LFPs allowed an accurate estimation of the oscillation phase. Therefore, an absolute phase was assigned to each action potential that occurred during an oscillatory epoch. The mean distribution of action potentials relative to the phase of LFP oscillation (beta or gamma) was represented by phase histograms (20 bins), where the peak and the trough of the wave were assigned to 0 and π , respectively. From these histograms, circular mean, circular standard deviation and circular dispersion were calculated (Fisher, 1993). Circular dispersion provides the phase-locking strength between LFP oscillations and spikes. Rayleigh's uniformity test was used to calculate the probability that the data were uniformly distributed (null hypothesis), with a level of significance set at $P < 0.05$.

Results

In the anaesthetized rat, activity in the OB undergoes dramatic changes when an olfactory stimulation takes place. As described in many studies, odour stimulation evokes both unitary spiking activity and transient epochs of oscillations of LFPs in two distinct frequency bands. In this study, we analysed the individual responses of M/T



cells, and the relationship between these individual responses and activity in the local field.

Spiking behaviour of M/T cells is too complex to be analysed using a simple classification based on whether the frequency increases, decreases or remains the same. This can be illustrated by examples of M/T cell activities in Fig. 2. Raw traces (Fig. 2A and B) were recorded from the same cell but in response to two different odours. In Fig. 2A, spiking activity is maintained throughout odour stimulation during which spikes are mostly fired during episodes of gamma oscillations; in Fig. 2B, odour stimulation appears to inhibit progressively spiking activity, furthermore spikes are mostly fired during episodes of beta oscillations. The firing pattern is better illustrated with raster-plots (Fig. 2C and D) These raster-plots represent spiking activity relative to respiration in successive respiratory cycles, stacked vertically, before, during and after odour stimulation. The average respiratory cycle is represented in time, the position of spikes on the cycle are indicated in phase. Figure 2C and D shows how one same cell can respond with two different respiratory patterns to two different odours. Figure 2E illustrates a typical odour-evoked excitatory-simple-synchronized pattern (cf. Materials and methods) with a strong increase in the number of emitted spikes, synchronized with phase 0 of the respiratory cycle. This particular phase corresponds to the transition between inspiration and expiration (I/E transition). In contrast, Fig. 2F illustrates a typical odour-evoked suppressive-simple-synchronized pattern, marked by a strong decrease in the number of emitted spikes at phase 0 (I/E transition). Excitatory-simple-synchronized activities (S+) represented 43% of cell responses ($n = 454$), inhibitory-simple-synchronized activities (S-) represented 17.7% of cell responses ($n = 188$). Some units presented several peaks or troughs in spike emission in several different positions of the respiratory cycle. Such units were classified as complex-synchronized and represented 26% of cell responses ($n = 307$). Because complex-synchronized patterns are highly heterogeneous, we did not include them in this study. If patterns are strongly marked, they are not however a fixed feature of the cell. Figure 2G illustrates a cell that spontaneously presented an S+ pattern while exhibiting a S- pattern during odour. An important fact is that odour stimulation may not induce a change in mean firing frequency but still induce a change in pattern. The unit presented in Fig. 2G undergoes a dramatic change in firing pattern, and yet this cell would have been classified as non-responsive if we had characterized cell responses simply in terms of a change in mean spike rate between spontaneous and odour-evoked activities (mean firing frequencies: spontaneous = 81.1 Hz, odour-evoked = 78.8 Hz). We therefore preferred to use a classification of M/T cells activity as a function of the temporal distribution of their spikes along the respiratory cycle, as extensively described elsewhere (Chaput *et al.*, 1992).

During odour stimulation, LFPs present alternating episodes of oscillations in the gamma and the beta frequency ranges (40–80 and 10–35 Hz, respectively), as previously described (Cenier *et al.*, 2008). If we represent on one figure the mean respiratory phase and mean

firing frequency of each S+ and S- unit, and the mean respiratory phase of LFP oscillations during odour stimulation (Fig. 3A), it is evident that a temporal correspondence exists between LFP oscillations and the different patterns of unitary activities. The firing of S+ activities and LFP gamma oscillations appear around the same position in the respiratory cycle (i.e. the I/E transition), and the same can be said for S- activities and LFP beta oscillations. However, this figure is based on averaged phases, one must keep in mind that a unit presenting an S+ pattern may yet emit some spikes during epochs of beta oscillations (e.g. in Fig. 2E, the response is clearly of the S+ types, yet some spikes are emitted at the beginning of inspiration and the end of expiration), conversely units showing an S- response will emit a few spikes during epochs of gamma oscillations. During spontaneous activity (Fig. 3B), there is very little activity in the LFPs, yet, overall, the mean respiratory phase of S+ and S- activities remains the same. It appears that most of the units presenting an S+ or S- pattern during stimulation already present this pattern during spontaneous activity, while others undergo a reorganization of their discharge pattern.

Below we examine more closely the temporal relationships between LFP oscillations and cellular spiking patterns.

Are spiking and oscillatory frequencies in the same range?

Figure 4 shows normalized ISI histograms for S+ and S- units, and it compares spontaneous activity and odour-evoked activities during beta and gamma epochs of LFP oscillations. We recorded 439 S+ responses, 49.7% of their spikes were emitted during odour stimulation, 15.6% and 34.7% of spikes were emitted during spontaneous activity and odour washout, respectively. In S+ responses, on average, 14.5% of spikes that were emitted during odour stimulation occur during epochs of gamma oscillations and 16.7% occur during epochs of beta oscillations. We recorded 185 S- activities with 34.8%, 33.1% and 32.1% of their spikes during spontaneous activity, odour stimulation and odour washout, respectively. During odour stimulation, on average, 4.7% and 7.5% of emitted spikes occur at epochs of gamma and beta oscillations, respectively. Histograms show the distribution of intervals in ms for all spikes emitted by S+ (Fig. 4A) and S- (Fig. 4B) activities during spontaneous activity and during epochs of gamma and beta oscillations. Within S+ and S- patterns, no significant difference in ISI distribution is observed over the three different activity periods (two-sample Kolmogorov–Smirnov test, P -value > 0.05). Across patterns, ISI distributions of S+ and S- units during spontaneous activity are not significantly different; however, ISI distributions are significantly different between S+ and S- units during beta oscillations (two-sample Kolmogorov–Smirnov test, P -value = 0.011) and gamma oscillations (two-sample Kolmogorov–Smirnov test, P -value < 0.001). Thus, the distribution of ISIs varies with the respiratory pattern of the response, while occurrences of LFP oscillations will have no repercussion on the distribution of ISIs.

FIG. 2. Examples of typical mitral and tufted cells activities. (A and B) Bottom: raw data collected from the same electrode in response to two different odors, not filtered. Top: expanded view of the raw data. Top right: spike waveforms. Odor stimulation epoch is indicated by the black bar below, odors are (A) isoamyl-acetate and (B) ethyl-valerate. (C–G) Raster plots of response patterns. Rasters in C and D correspond to the recordings showed in A and B. Each raster plot in E, F and G corresponds to a different unit and the odor used for stimulation is isoamyl-acetate in all three cases. Rows represent the position of spikes on a respiratory cycle; consecutive cycles are stacked vertically from bottom to top. Respiratory phase is indicated as ranging from $-\pi$ (beginning of inspiration) to π (end of expiration). Average duration of a respiratory cycle is 570 ± 79 ms in spontaneous activity and 579 ± 74 ms during odor stimulation. Phase 0 is attributed to the transition between inspiration and expiration. To facilitate the understanding of the figure, we added an average respiratory cycle (thick black trace); negative deflection indicates inspiration, positive deflection indicates expiration, and the transition between inspiration and expiration is indicated with a thin vertical black line. This respiratory cycle is represented in real time (time-bar = 50 ms), not in phase, however phases $-\pi$, 0, π (x-axis ticks) correspond to both raster plots and respiratory cycle. Cycles with negative numbers correspond to spontaneous activity (circles), positive cycle numbers correspond to odor stimulation (triangles) and odor-washout (tripods).

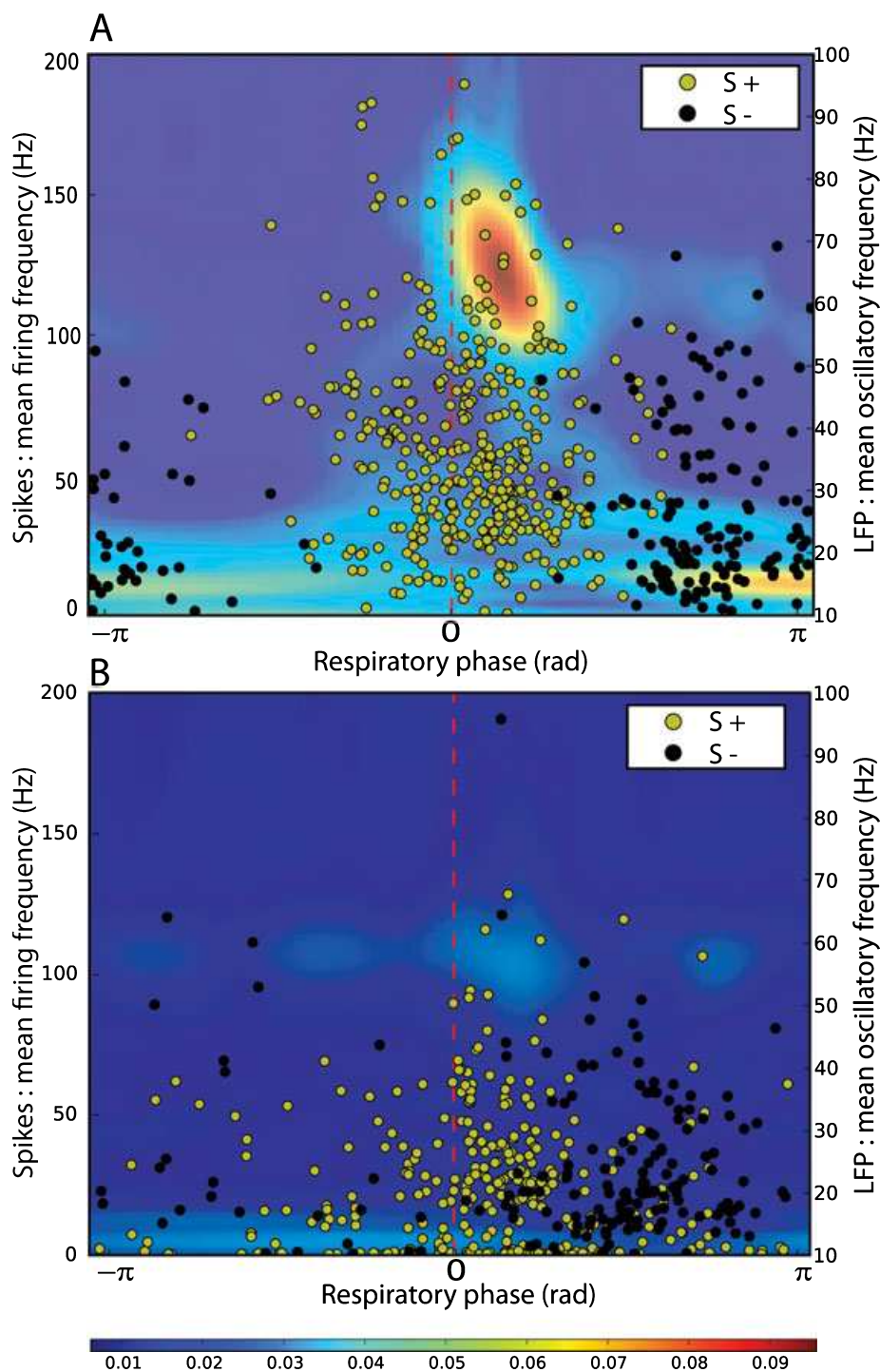


FIG. 3. Temporal organization of unitary activity and LFP oscillations. Foreground: dots represent the mean respiratory phase and spiking frequency (mean $1/\text{ISI}$, Hz) of S+ and S- units, one dot corresponding to one unit. Background: average phase-frequency representations of oscillatory activity in the LFPs. Energy is coded in luminance (the calibration scale below is common to both representations, in arbitrary units). Both LFP oscillations and mean units activity are represented relative to their position in the respiratory cycle, indicated in phase from $-\pi$ to π , corresponding, respectively, to the beginning of inspiration and the end of expiration. Phase 0 indicates the transition between inspiration and expiration (white dotted line). The respiratory phase of oscillations and spikes shown here was linearized with the process described in the methods section. Epochs of oscillations last on average 74 ± 42 and 221 ± 128 ms in gamma and beta bands respectively. (A) Activities of units and LFPs during odor stimulation. (B) Activities of units and LFPs during spontaneous activity. Units indicated as S+ and S- were classified according to their odor-evoked spike patterns.

We then focused on our ISI histograms to study more closely the ISI corresponding to beta and gamma frequency ranges (12–25 ms for gamma, 33–66 ms for beta; Fig. 4C). In general, S+ units present a significantly higher proportion of gamma range intervals than S- units

(Mann–Whitney test, P -value < 0.001), while S- units have a significantly higher proportion of beta range intervals than S+ units (Mann–Whitney test, P -value < 0.001). Hence, units that tend to fire coincidentally with LFP gamma or beta oscillations emit spike trains

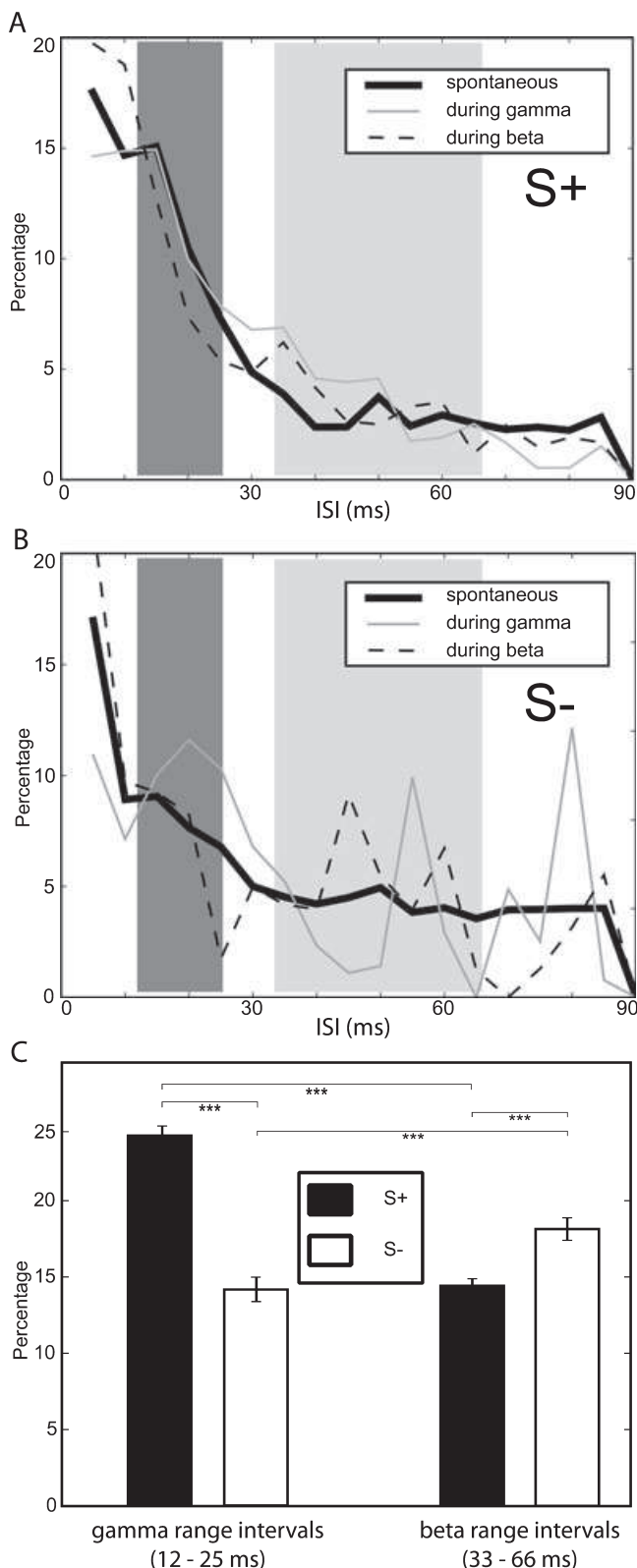


FIG. 4. M/T cells rhythmic activities. ISI histograms (in milliseconds) of (A) S+ and (B) S- activities during spontaneous periods (thick solid line), gamma episodes (thin solid line), and beta episodes (dotted line). Dark gray backgrounds indicate gamma range intervals, light gray indicates beta range intervals. Bin size is 5 ms. (C) Percentage of gamma range intervals (12–25 ms, left bars) and of beta range intervals (33–66 ms, right bars) in the ISI distribution of S+ and S- units (black and white bars, respectively). Statistical tests: Mann–Whitney test, *** P -value < 0.001.

containing a significant amount of inter-spike intervals in the range of LFP oscillation frequencies.

Is there a phase-locking between spikes and LFP oscillations?

Significant numbers of gamma or beta intervals in spike trains do not, however, bring significant information on the temporal relationship between LFP oscillations and spiking activities. In order to further investigate the matter we measured the LFP phase for each spike emitted during beta and gamma epochs of oscillations. Then we constructed spike phases histograms for both beta and gamma bands and for all neurons. The significance of phase-locking between spikes and LFP was tested on the global histogram (Rayleigh test, P -value < 0.05). First, we analysed phase-locking between S+ or S- spikes and gamma or beta oscillations (Fig. 5A and B). We observed a significant deviation from a uniform phase distribution toward a phase preference for peak negativity of the LFP oscillation, which indicates strong phase-locking in two cases: (i) between gamma oscillations and spikes from S+ responses (Fig. 5A; mean phase = 2.76, circular dispersion = 12.75, Rayleigh test, P -value < 0.001); and (ii) between beta LFP oscillations and spikes from S- activities (Fig. 5B; mean phase = 3.06, circular dispersion = 6.43, Rayleigh test, P -value < 0.001). Conversely, no phase-locking was found between S- spikes and gamma waves (not shown, Rayleigh test, P -value = 0.37, circular dispersion = 30.6), or between spikes from S+ units and beta oscillations (not shown, Rayleigh test, P -value = 0.11, circular dispersion = 284).

In the second step, we ran the same analysis with units emitting only one spike during an episode of LFP oscillations (Fig. 5C). Interestingly, we observed a strong phase-locking between those unique spikes and the gamma oscillation (Fig. 5C, left; mean phase = 2.83, phase dispersion = 8.2, n = 180, Rayleigh test, P -value < 0.0001). Therefore, even when a single spike is emitted during a gamma burst, its phase is not random. Conversely, a quasi-null phase-locking was observed between unique spikes and beta oscillations (Fig. 5C, right; mean phase = 2.51, phase dispersion = 27.82, n = 88, Rayleigh test, P -value = 0.03). This shows that gamma episodes are prone to show phase-locking, while phase-locking on beta episodes is harder to achieve.

As shown in Fig. 3, the mean firing rate of units covers a wide range of frequencies for both S+ and S- patterns. Therefore, we have tested the range of compatible frequencies that allowed phase-locking between LFP oscillations and unit activities. This was done by analysing phase-locking for different ranges of spike firing rates separately (0–10 Hz, 10–20, ..., 100–110 Hz). The results are reported in Table 1A. For gamma oscillations, we found a significant coupling with spikes, provided the spike rate was in the range of 20–80 Hz. Hence, spike coupling with gamma oscillations tolerates a large range of spike rates. When the same analysis was performed on beta oscillations, we found that phase-locking was favoured only for spike rates ranging from 10 to 30 Hz (Table 1B). This confirms our assumption that phase-locking with beta oscillations is strong only for S- discharges because they are in a compatible frequency range.

These results suggest that a relationship exists between M/T cell spikes and LFP oscillations, provided that the LFP and intrinsic unit frequency are in a similar range. This coupling between LFP and cells in the gamma range appears to be very powerful and robust: it is observed for a wide range of spiking frequencies, and even when a single spike is emitted by the unit during the entire gamma oscillation episode. Conversely, coupling in the beta range is achieved only when both frequencies are in a compatible range, which is only the case for S- type units.

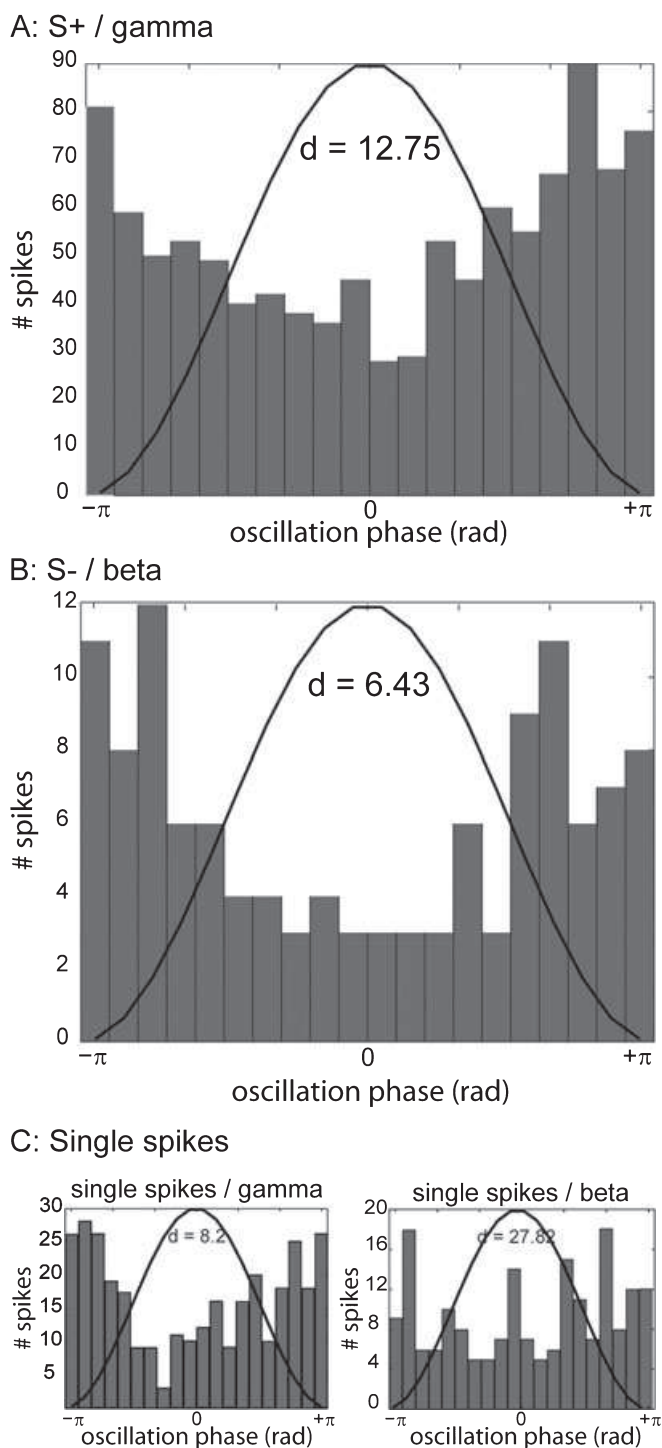


FIG. 5. Units' phase-locking on LFP oscillations. (A) Phase-locking between spikes from all S+ responses and gamma oscillations. (B) Phase-locking between spikes from all S- responses and beta oscillations. (C) Phase-locking between spikes and LFP gamma (left) or beta (right) oscillations only for discharges containing a single spike during the oscillatory episode. For all histograms: x-axis = oscillation phase (in rad); a mean cycle is represented by a thin sinusoid; d = circular dispersion.

Discussion

The main question we asked in this study was: to what extent is the activity of individual M/T cells influenced by, and coupled to, LFP oscillations? We demonstrated that there is temporal coherence

TABLE 1. Analysis of phase-locking for different ranges of spike firing rates

Spike rate	Circular dispersion	P-value (Rayleigh test)
(A) Gamma oscillations (Hz)		
0–10	1.98	0.18
10–20	15.61	0.24
20–30	9.91	0.013*
30–40	11.23	0.009*
40–50	7.62	0.002*
50–60	5.63	< 0.0001*
60–70	3.69	< 0.0001*
70–80	5.00	0.002*
80–90	21.18	0.32
90–100	11.99	0.14
100–110	11.58	0.16
(B) Beta oscillations (Hz)		
0–10	262.94	0.81
10–20	30.33	0.007*
20–30	42.78	0.04*
30–40	94.64	0.31
40–50	152.14	0.59
50–60	38.05	0.089
60–70	1075	0.92
70–80	538.58	0.90
80–90	21.53	0.14
90–100	29.76	0.28
100–110	27.63	0.26

LFP and action potentials phase coupling. (A) Strength of phase-coupling between spikes and gamma oscillations according to the spike–frequency range (B) Strength of phase-coupling between spikes and beta oscillations according to the spike–frequency range. In each analysis, all response patterns have been combined. * $P < 0.05$, significant coupling (Rayleigh test).

between spike trains and oscillations of the LFP. S+ spikes and gamma LFP oscillations occur at the same time and most of the spikes are phase-locked with gamma oscillations. S- spikes and beta LFP oscillations occur at the same time and, if they are in the limited frequency range of 10–30 Hz, spikes are phase-locked on beta oscillations. While spike/LFP coupling has been previously reported in the gamma regime (*in vivo*: Eeckman & Freeman, 1990; Kashiwadani *et al.*, 1999; Charpak *et al.*, 2001; *in vitro*: Lagier *et al.*, 2004), we report here for the first time phase-coupling between M/T cell spikes and beta oscillations in the mammalian OB. Even if the number of spikes emitted during beta oscillations represents a small percentage of the total number of spikes, this proportion is probably much more important during the animal behaviour. Indeed, while beta oscillations do not occur in all respiratory cycles in the anaesthetized preparation (Cenier *et al.*, 2008), such epochs are more recurrent and longer in the behaving animal (Martin *et al.*, 2004). Hence it is probable that a higher proportion of M/T spikes are emitted during LFP oscillations in awake animals.

Respiratory dynamics pre-tune M/T cell spike rate

The importance of the respiratory cycle has been demonstrated in a number of behavioural (Uchida & Mainen, 2003), imaging (Spors *et al.*, 2006) and electrophysiological (Buonviso & Chaput, 1990; Buonviso *et al.*, 1992, 2003; Cenier *et al.*, 2008) studies. Here, we show that respiration-patterned S+ or S- activities preferentially displayed a spike dynamic in the gamma or beta range, respectively. Respiratory dynamics set the respiratory patterns of M/T cells (S+, S-, complex), likely by way of glomerular activation and/or centrifugal modulation (Buonviso *et al.*, 2006). It is likely that the

level of glomerular activation strongly influences M/T cell dynamics. M/T cells connected to strongly activated glomeruli will mainly display S+ activities and spike intervals in the gamma range will be favoured. In contrast, M/T cells connected to weakly or unactivated glomeruli will mainly exhibit S- behaviour and spike intervals in the beta range (Buonviso & Chaput, 1990; Buonviso *et al.*, 1992). Because glomerular activation patterns are themselves strongly modified by sniffing behaviour (Verhagen *et al.*, 2007), a single cell can probably shift in pattern along the successive respiratory cycles.

Spike phase-locking with gamma and beta LFP oscillations: two different mechanisms?

We then observed that: (i) during oscillatory episodes, an important proportion of spikes are phase-locked with LFP oscillations; and (ii) the range of spike rate permitting phase-locking is limited, particularly for beta oscillations. Thus, spikes can phase-lock with the gamma or beta oscillations if their instantaneous frequency is in the range of oscillation frequency. It must be noted that phase-locking is harder to achieve as oscillation frequency increases as the time window for acute phase-locking gets increasingly narrower. This principle might account partially for the difference in circular dispersion between the two regimes (see Results; Fig. 5). A strong influence of LFP oscillations on spiking discharges has often been reported in different systems for various frequency ranges. For example, theta oscillations have been shown to modulate neural activity in the hippocampus (Buzsaki & Eidelberg, 1983). A high correlation between spiking activity and gamma LFP has been described in the Heschl's gyrus (Mukamel *et al.*, 2005). Similarly, burst firing in different auditory cortical fields is related to spindling LFP activity (Valentine & Eggemont, 2001). However, our results suggest that neither beta nor gamma LFP oscillations strongly influence M/T cell population spiking frequency. Nevertheless, we observed that phase-locking with gamma oscillations is a powerful mechanism because it is possible for a large range of spike rates, even when a spike train is reduced to a single spike in an oscillatory burst. We explored the strength of gamma coupling in a conductance-based model of mitral cells (David, F., Hugues, E., Fourcaud-Trocmé, N. and Buonviso, N., unpublished observations). The model predicts that entrainment is maximal at the gamma frequency, when the level of mitral cell conductance is maximal. This high conductance corresponds to a time when M/T cells are receiving both maximal peripheral activation (Spors *et al.*, 2006) and maximal synaptic inhibition (Margrie & Schaefer, 2003). This moment likely corresponds to the inspiration/expiration transition point (Chaput, 2000). We hypothesize that the gamma regime can underlie the spike entrainment process classically observed between couple oscillators (Pikowski *et al.*, 2001; Izhikevitch, 2007). The beta regime does not seem to be as suitable for the entrainment process, as seen in the lack of influence on spike frequencies and the limited phase-locking we observed. This hypothesis must be tested in a mitral cell model.

Origin of gamma and beta rhythms

The origin of LFP oscillations is relatively well known; even if they do not recruit the same circuits, beta and gamma LFP oscillations are both generated by synaptic currents in granule cells as demonstrated by a current source analysis study (Neville & Haberly, 2003). While gamma oscillations are intrinsic to the OB circuitry (Gray & Skinner, 1988; Neville & Haberly, 2003; Martin *et al.*, 2006), beta oscillations depend on an intact bidirectional connection between the OB and

piriform cortex (Neville & Haberly, 2003; Martin *et al.*, 2006). In opposition to that, cellular mechanisms underlying the high proportion of gamma and beta intervals observed in S+ and S- activities, respectively, remain to be elucidated. In a recent study in behaving rats, Fuentes *et al.* (2008) reported that rhythmic discharges of units in the OB appear as an intrinsic property, not directly related to odorant stimulation. M/T unit behaviour during LFP oscillations could thus reflect intrinsic properties of the cells. Indeed, M/T cells are known to display subthreshold oscillations of their membrane potential (Desmaisons *et al.*, 1999; Debarbieux *et al.*, 2003; Balu *et al.*, 2004; Lagier *et al.*, 2004). In OB slices, these subthreshold oscillations range in frequency from 10 to 50 Hz as a function of resting membrane potential (Desmaisons *et al.*, 1999), thereby potentially covering beta and gamma ranges. Nevertheless it cannot be excluded that M/T cell rhythmic activity can be generated or amplified by network dynamics or rhythmic synaptic input (Lagier *et al.*, 2004).

Conclusion: respiration gates the formation of gamma- and beta-assemblies

Phase-locking between spikes and LFP oscillations has been described in different systems. However, the distinctive and noteworthy feature of such coupling in the OB is that it seems to be gated by respiratory dynamics of M/T cells. Our hypothesis is that, first, glomerular input imposes the respiratory pattern of M/T cells, S+ or S-. This respiratory pattern pre-tunes spike frequency of units so that they will preferentially be coupled with gamma or beta oscillations. The dynamic consequence of such a function is that two neuronal assemblies alternate according to the LFP oscillatory dynamics: a gamma-assembly consisting of neurons phase-locked with gamma oscillations; and a beta-assembly consisting of cells phase-locked with beta oscillations. During periods of strong peripheral activation (inspiration), gamma-assemblies predominate while beta-assemblies appear during periods of weaker activation (expiration). This process may be quite flexible, because a single cell could participate in one or the other assembly according to its discharge frequency, which is set by its respiratory pattern. The robust coupling between spikes and gamma oscillations could subserve a 'communication through coherence' function (Fries, 2005): during gamma oscillations, information can be transferred toward the cortex (Litaudon *et al.*, 2008). Because coupling with beta oscillations seems to be more restricted, beta-assemblies should be more selective than gamma ones. Beta-assemblies may, thus, represent a fine tuning of bulbar activity, which allows specific cognitive processes in the waking animal. This assumption is supported by the observation that beta oscillations are associated with learned (Martin *et al.*, 2004) and predator odours (Zibrowski & Vanderwolf, 1997). In the behaving animal, beta- and gamma-assemblies likely are assembled and disassembled according to sniffing behaviour (Verhagen *et al.*, 2007), making the search for an olfactory code quite difficult in the awake model.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the French national research agency (ANR).

References

- Balu, R., Larimer, P. & Strowbridge, B.W. (2004) Phasic stimuli evoke precisely timed spikes in intermittently discharging mitral cells. *J. Neurophysiol.*, **92**, 743–753.

- Buonviso, N. & Chaput, M.A. (1990) Response similarity to odors in olfactory bulb output cells presumed to be connected to the same glomerulus: electrophysiological study using simultaneous single-unit recordings. *J. Neurophysiol.*, **63**, 447–454.
- Buonviso, N., Chaput, M.A. & Berthommier, F. (1992) Temporal pattern analyses in pairs of neighboring mitral cells. *J. Neurophysiol.*, **68**, 417–424.
- Buonviso, N., Amat, C., Litaudon, P., Roux, S., Royet, J.P., Farget, V. & Sicard, G. (2003) Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *Eur. J. Neurosci.*, **17**, 1811–1819.
- Buonviso, N., Amat, C. & Litaudon, P. (2006) Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. *Chem. Senses*, **31**, 145–154.
- Buzsaki, G. & Eidelberg, E. (1983) Phase relations of hippocampal projection cells and interneurons to theta activity in the anesthetized rat. *Brain Res.*, **266**, 334–339.
- Cajal, S.R. (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, Édition. Maloine, Paris.
- Cenier, T., Amat, C., Litaudon, P., Garcia, S., Lafaye de Micheaux, P., Liquet, B., Roux, S. & Buonviso, N. (2008) Odor vapor pressure and quality modulate LFP oscillatory patterns in the olfactory bulb of anesthetized rat. *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 1432–1442.
- Chaput, M.A. (2000) EOG responses in anesthetized freely breathing rats. *Chem. Senses*, **25**, 695–701.
- Chaput, M.A., Buonviso, N. & Berthommier, F. (1992) Temporal patterns in spontaneous and odour-evoked mitral cell discharges recorded in anaesthetized freely breathing animals. *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 813–822.
- Charpak, S., Mertz, J., Beaurepaire, E., Moreaux, L. & Delaney, K. (2001) Odor-evoked calcium signals in dendrites of rat mitral cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98**, 1230–1234.
- Debarbieux, F., Audinat, E. & Charpak, S. (2003) Action potential propagation in dendrites of rat mitral cells in vivo. *J. Neurosci.*, **23**, 5553–5560.
- Desmairons, D., Vincent, J.D. & Lledo, P.M. (1999) Control of action potential timing by intrinsic subthreshold oscillations in olfactory bulb output neurons. *J. Neurosci.*, **19**, 10727–10737.
- Eeckman, F.H. & Freeman, W.J. (1990) Correlations between unit firing and EEG in the rat olfactory system. *Brain Res.*, **528**, 238–244.
- Engel, A.K., Fries, P., König, P., Brecht, M. & Singer, W. (1999) Temporal binding, binocular rivalry, and consciousness. *Conscious. Cogn.*, **8**, 128–151.
- Fisher, N.I. (1993) *Statistical Analysis of Circular Data*, Cambridge University Press Edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Friedrich, R.W., Habermann, C.J. & Laurent, G. (2004) Multiplexing using synchrony in the zebrafish olfactory bulb. *Nat. Neurosci.*, **7**, 862–871.
- Fries, P. (2005) A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. *Trends Cogn. Sci.*, **9**, 474–480.
- Fries, P., Roelfsema, P.R., Engel, A.K., König, P. & Singer, W. (1997) Synchronization of oscillatory responses in visual cortex correlates with perception in interocular rivalry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **94**, 12699–12704.
- Fuentes, R.A., Aguilar, M.I., Aylwin, M.L. & Maldonado, P.E. (2008) Neuronal activity of mitral-tufted cells in awake rats during passive and active odorant stimulation. *J. Neurophysiol.*, **100**, 422–430.
- Gray, C.M. & Skinner, J.E. (1988) Centrifugal regulation of neuronal activity in the olfactory bulb of the waking rabbit as revealed by reversible cryogenic blockade. *Exp. Brain Res.*, **69**, 378–386.
- Izhikevitch, E. (2007) *Dynamical Systems in Neuroscience*. MIT Press, Cambridge, MA, USA.
- Kashiwadani, H., Sasaki, Y.F., Uchida, N. & Mori, K. (1999) Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular receptive ranges in the rabbit olfactory bulb. *J. Neurophysiol.*, **82**, 1786–1792.
- Kronland-Martinet, R., Morlet, J. & Grossmann, A. (1987) Analysis of sound patterns through wavelet transforms. *Int. J. Pattern Recognit. Artif. Intell.*, **1**, 273–302.
- Lagier, S., Carleton, A. & Lledo, P.M. (2004) Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *J. Neurosci.*, **24**, 4382–4392.
- Laurent, G. & Davidowitz, H. (1994) Encoding of olfactory information with oscillating neural assemblies. *Science*, **265**, 1872–1875.
- Laurent, G., Wehr, M. & Davidowitz, H. (1996) Temporal representations of odors in an olfactory network. *J. Neurosci.*, **16**, 3837–3847.
- Litaudon, P., Garcia, S. & Buonviso, N. (2008) Strong coupling between pyramidal cell activity and network oscillations in the olfactory cortex. *Neuroscience*, **156**, 781–787.
- Margrie, T.W. & Schaefer, A.T. (2003) Theta oscillation coupled spike latencies yield computational vigour in a mammalian sensory system. *J. Physiol.*, **546**, 363–374.
- Martin, C., Gervais, R., Hugues, E., Messaoudi, B. & Ravel, N. (2004) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *J. Neurosci.*, **24**, 389–397.
- Martin, C., Gervais, R., Messaoudi, B. & Ravel, N. (2006) Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity. *Eur. J. Neurosci.*, **23**, 1801–1810.
- Mukamel, R., Gelbard, H., Arieli, A., Hasson, U., Fried, I. & Malach, R. (2005) Coupling between neuronal firing, field potentials, and fMRI in human auditory cortex. *Science*, **309**, 951–954.
- Neville, K.R. & Haberly, L.B. (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J. Neurophysiol.*, **90**, 3921–3930.
- Pikovski, A., Rosenblum, M. & Kurths, J. (2001) *Synchronization: A Universal Concept in Non-Linear Sciences*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Roux, S.G., Garcia, S., Bertrand, B., Cenier, T., Vigouroux, M., Buonviso, N. & Litaudon, P. (2006) Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. *J. Neurosci. Methods*, **152**, 173–178.
- Roux, S.G., Cenier, T., Garcia, S., Litaudon, P. & Buonviso, N. (2007) A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal. *J. Neurosci. Methods*, **160**, 135–143.
- Sherrington, C.S. (1906) *The Integrative Action of the Nervous System*. Yale University Press, New Haven, CT.
- Spors, H., Wachowiak, M., Cohen, L.B. & Friedrich, R.W. (2006) Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. *J. Neurosci.*, **26**, 1247–1259.
- Stopfer, M., Bhagavan, S., Smith, B.H. & Laurent, G. (1997) Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature*, **390**, 70–74.
- Uchida, N. & Mainen, Z.F. (2003) Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nat. Neurosci.*, **6**, 1224–1229.
- Valentine, P.A. & Eggemont, J.J. (2001) Spontaneous burst-firing in three auditory cortical fields: its relation to local field potentials and its effect on inter-area cross-correlations. *Hear. Res.*, **154**, 146–157.
- Verhagen, J.V., Wesson, D.W., Netoff, T.I., White, J.A. & Wachowiak, M. (2007) Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nat. Neurosci.*, **10**, 631–639.
- Zibrowski, E.M. & Vanderwolf, C.H. (1997) Oscillatory fast wave activity in the rat pyriform cortex: relations to olfaction and behavior. *Brain Res.*, **766**, 39–49.

2.3 Développement des méthodes

LES DEUX RÉSUMÉS CI-APRÈS décrivent les méthodes utilisées pour le traitement des données biologiques présentées ici. Le développement de ces méthodes a fait partie intégrante du travail effectué pendant cette thèse. La base théorique en traitement du signal a été apportée par le Dr. Stéphane Roux (Laboratoire de physique, École Normale Supérieure, Lyon). Son expertise nous a été extrêmement précieuse pour discerner les particularités physiques du signal que nous enregistrons et pour déterminer les méthodes à appliquer pour répondre à nos exigences. C'est le Dr. Roux également qui a écrit la première version logicielle intégrant ces méthodes. C'est en utilisant ce premier logiciel, en assimilant mes premières notions de théorie du traitement du signal et en effectuant mes premiers pas dans le monde de la programmation informatique enregistrée que j'ai pu dialoguer en retour avec le Dr. Roux. Sur la base de ce dialogue, nous avons pu converger vers un ensemble d'outils adaptés aux caractéristiques physiques de notre signal et permettant d'y rechercher les réponses à nos questions biologiques. Le projet a ensuite fait un pas de géant avec l'arrivée de Samuel Garcia (ingénieur d'étude) dans le laboratoire qui a reprogrammé un nouveau logiciel, toujours sur la base théorique apportée par Stéphane Roux mais employant des algorithmes optimisés et en l'associant à un système de base de données permettant le stockage et la manipulation des données numériques. Dans sa version actuelle, le logiciel OpenElectrophy est distribué librement sous licence CeCILL.



FIG. 2.1: OpenElectrophy, suite logicielle versatile d'analyse et de traitement des signaux électrophysiologiques.

Cette étape dans mon travail de thèse fut longue mais passionnante et a demandé l'acquisition de nombreuses compétences hors du domaine de ma formation universitaire. Ces efforts ont été couronnés par la publication de ces deux articles de méthodes dont le texte intégral figure en annexe, page 126.

LE CYCLE RESPIRATOIRE UTILISÉ COMME BASE DE TEMPS : UNE MÉTHODE OPTIMISÉE POUR LE MOYENNAGE DES ÉVÈNEMENTS NEURONAUX OLFACTIFS

Respiratory cycle as time basis : An improved method for averaging olfactory neural events.

Stéphane G. Roux, Samuel Garcia, Bernard Bertrand, Tristan Cenier, Michel Vigouroux, Nathalie Buonviso, Philippe Litaudon

Publié dans *Journal of Neuroscience Methods*, accepté le 2 septembre 2005.

LE SIGNAL RESPIRATOIRE, même chez l'animal anesthésié, est variable. Il peut changer en amplitude et en fréquence entre deux individus différents mais également au cours d'une session d'enregistrement chez un même individu. Puisque de nombreux éléments dans le signal électrophysiologique bulbaire sont organisés temporellement par rapport à la respiration, il nous a fallu développer une méthode permettant de passer outre ces variations et de comparer les enregistrements effectués chez un même individu et entre plusieurs individus. Si le cycle respiratoire est variable dans le temps, il est en revanche immuable dans sa séquence, du moins chez l'animal anesthésié : l'inspiration est toujours suivie d'une expiration, elle même suivie de l'inspiration d cycle suivant. L'idée fut donc de transformer l'information de temps en une information de phase. Certains points remarquables du cycle sont détectés automatiquement et se voient attribuer les phases $-\pi$ et π pour le début et la fin du cycle, et la phase 0 pour la transition entre l'inspiration et l'expiration. Le cycle respiratoire est ensuite linéarisé avec un nombre d'échantillon fixe entre ces phases. Le signal électrophysiologique enregistré conjointement est ensuite adapté à cette nouvelle base de temps. La compression ou dilatation du signal introduirait du bruit dans le signal et nous avons donc choisi d'opérer un rééchantillonnage du signal : chaque échantillon du signal respiratoire est repérée selon son indice et le signal électrophysiologique ne conservera que ses échantillons portant le même indice. L'article décrit la méthode d'enregistrement de la respiration, la méthode de détection automatique des phases remarquables, la méthode de linéarisation et de rééchantillonnage. Il présente également les méthodes de moyennage disponibles et compare des cartes temps-fréquence moyennes réalisées avant et après linéarisation du signal respiratoire.

UNE MÉTHODE D'EXTRACTION DES PHASES SUR UN SIGNAL MULTI-FRÉQUENTIEL, BASÉE SUR LA TRANSFORMÉE PAR ONDELETTES.

A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal.

Stéphane G. Roux, Tristan Cenier, Samuel Garcia, Philippe Litaudon, Nathalie Buonviso.

Publié dans *Journal of Neuroscience Methods*, accepté le 4 septembre 2006.

AU CŒUR DE NOTRE ÉTUDE est l'analyse des liens temporels entre les décharges unitaires et les phénomènes dynamiques dans le bulbe. Si les méthodes d'analyse des événements unitaires sont nombreuses et connues, il n'en va pas de même des outils disponibles pour analyser les oscillations des LFP. Tout d'abord, l'étude de ces signaux n'a vraiment pris de l'ampleur que récemment et peu de méthodes dédiées ont vu le jour encore. De plus, dans notre cas les oscillations des LFP sont des phénomènes discrets et discontinus, ils existent dans deux bandes de fréquence distinctes mais peuvent néanmoins varier en fréquence à l'intérieur de ces bandes, souvent même pendant un même épisode oscillatoire. Le choix de l'utilisation des ondelettes pour analyser ces oscillations se justifie par leur robustesse face aux variations de fréquence et à la discontinuité du signal. Elles permettent en outre d'analyser le signal sur une large bande de fréquence, sans avoir à définir des filtres aux bornes précises. Une ondelette est une petite oscillation. Il en existe plusieurs types, celle que nous utilisons est l'ondelette complexe de Morlet, qui s'obtient par le produit d'une sinusoïde et d'une gaussienne. La sinusoïde variera en fréquence sur une bande prédéfinie, en l'occurrence de 10 à 100 Hz. La convolution entre le signal et les ondelettes produit une matrice de nombres complexes, la partie réelle étant le module, ou amplitude de l'oscillation à un temps et une fréquence donnée, et la partie imaginaire est l'angle, c'est à dire la phase instantanée du signal. L'information d'amplitude permet d'établir les cartes temps-fréquences des événements dynamiques du signal, ou les cartes phase-fréquence en combinaison avec la méthode de linéarisation du cycle respiratoire. L'information de phase va nous permettre de connaître la position précise des événements unitaires (les potentiels d'action) lorsqu'ils surviennent pendant les épisodes oscillatoires et donc de quantifier la relation temporelle existant entre AP et LFP. L'article présente le détail des ondelettes complexes de Morlet et de la convolution avec le signal, et compare cette méthode avec la transformée de Hilbert ou la transformée fenêtrée de Fourier. Il présente également une particularité algorithmique permettant l'optimisation de la méthode d'extraction précise des phases, dont le principe est une analyse en deux étapes à basse et haute résolution. Enfin, les limites de la méthode sont décrites et discutées, ainsi que sa robustesse par rapport au bruit.

PARTIE 3

DISCUSSION

3.1 L'alternance des rythmes bêta et gamma

LA PREMIÈRE ÉTUDE, page 79, portait sur la caractérisation des oscillations des LFP évoquées dans le bulbe olfactif en réponse à une série de stimulations olfactives par des odeurs présentant un gradient de variation de leurs traits physico-chimiques.

Nous avons montré que les oscillations évoquées pendant les régimes bêta et gamma sont significativement différentes entre elles, en fréquence, bien évidemment, mais également en durée et en position par rapport au cycle respiratoire. Les oscillations dans la bande gamma apparaissent strictement à la période de transition entre la phase d'inspiration et d'expiration, la position des oscillations bêta sur le cycle respiratoire est beaucoup moins stricte puisqu'on les retrouve pendant la phase d'expiration, voire au début de la phase d'inspiration du cycle suivant. La durée de ces oscillations concorde avec leur position, les bouffées gamma sont courtes et disparaissent rapidement après la transition, tandis que les oscillations bêta durent plus longtemps, comme si elles étaient moins contraintes par le décours du cycle respiratoire. La figure 3.1 compare la phase respiratoire et la durée moyenne des oscillations des LFP dans les deux régimes selon la fonction chimique portée par les molécules. Si l'on compare les oscillations gamma entre elles, leur phase respiratoire et leur durée sont très peu variables et en tout cas ne varient absolument pas en fonction des odeurs. Les oscillations dans la bande bêta par contre présentent une variabilité beaucoup plus grande dans leur durée et leur phase respiratoire. Si la variation de durée des oscillations bêta n'est pas odeur-spécifique, ce n'est pas tout à fait le cas de leur phase respiratoire, puisqu'elle semble varier avec la capacité de l'odeur à évoquer des oscillations dans la bande gamma. En effet, ainsi qu'il est décrit dans cette étude, la stimulation olfactive peut évoquer deux types de paysages oscillatoires, l'un présentant le motif d'alternance classique entre oscillations gamma et bêta, l'autre présentant des oscillations dans la seule bande bêta. Nous avons quantifié ce paramètre par une «odds-value» (OV), correspondant au rapport de probabilité d'obtenir l'un ou l'autre motif en réponse à une odeur. Les alcools sont caractérisés par des OV inférieures à 1, signifiant qu'ils vont majoritairement évoquer le motif «bêta seul», les esters sont caractérisés par des OV supérieures à 1, signifiant une majorité de motif «bêta+gamma»; la cétone et l'aldéhyde possèdent une OV très supérieure à 1. Si l'on rapproche les données de la figure 3.1 et les OV, il semble apparaître qu'en l'absence d'oscillations gamma, les oscillations dans la bande bêta prennent leur place à la phase de transition inspiration/expiration. À quoi correspond cette absence d'oscillations gamma ? Nous avons montré qu'il existe une relation

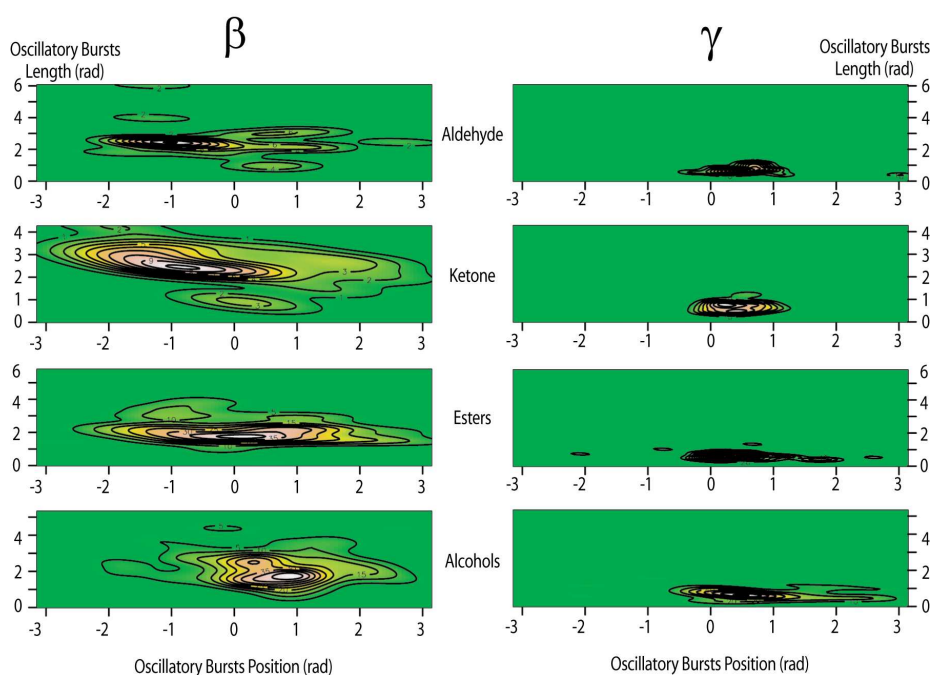


FIG. 3.1: Phase respiratoire et durée moyenne des oscillations gamma et bêta en fonction du groupe fonctionnel porté par les odeurs

La phase et la durée moyenne des oscillations sont représentées en densité, indiquée par le code couleur (vert : faible densité ; jaune : forte densité) et par les contours d'iso-densité (en noir). La phase du cycle respiratoire est indiquée en gradient, de $-\pi$ à π , le 0 correspondant à la transition inspiration/expiration. La durée relative des oscillations par rapport à la durée totale du cycle respiratoire est indiquée en gradient de 0 à 2π .

Source : T. Cenier, P. Lafaye de Michaux et B. Liqueur

entre la pression de vapeur d'une molécule et son OV associée et nous avons interprété cela comme étant une relation entre l'intensité de la stimulation olfactive et la capacité de cette stimulation à évoquer des oscillations gamma. Cependant, il existe plusieurs façons d'interpréter l'absence d'oscillations gamma : cela peut-être une absence d'oscillations gamma dans le bulbe, ou une absence d'oscillations gamma dans nos enregistrements. Le premier cas est peu probable, puisque même une stimulation avec une odeur à très faible pression de vapeur (A10) évoque des oscillations gamma chez 13 animaux sur un total de 24 enregistrés. Dans le deuxième cas, deux interprétations encore sont possibles, les oscillations gamma peuvent être présentes dans l'ensemble du bulbe, mais à un niveau d'amplitude trop faible pour être distinguées du bruit, ou elles peuvent être restreintes spatialement dans une (ou plusieurs) zone du bulbe, hors de portée d'enregistrement par notre électrode. De ces deux hypothèses, nous retenons la seconde, que nous défendons

de la façon suivante : lors du motif classique d'organisation des épisodes oscillatoires, les bouffées bêta et gamma ne sont jamais coïncidentes, mais toujours alternées, le gamma apparaissant à la transition inspiration/expiration, les bouffées bêta pendant la phase d'expiration. Donc si les oscillations gamma étaient présentes dans notre zone d'enregistrement, même à très faible amplitude, les oscillations bêta devraient apparaître à leur phase habituelle. Or, lors du motif «bêta seul», les oscillations bêta apparaissent à la transition inspiration/expiration, donc à la place des oscillations gamma. Nous en concluons donc que les oscillations gamma sont un phénomène spatialement restreint dans le bulbe, ce qui ne semble pas être le cas des oscillations bêta. Les résultats de cette première étude nous ont conduit à formuler l'hypothèse suivante : lorsque le message sensoriel afférent est fort, il évoque des oscillations à la fréquence gamma dans le réseau bulbaire, tandis que lorsque le niveau de ce message afférent est faible, c'est dans la bande de fréquence bêta que ces oscillations seront évoquées. Or nous avons montré que le fonctionnement de la boucle réciproque mitrales/granules était vraisemblablement à l'origine des oscillations dans ces deux régimes. En conséquence, nous avons supposé que l'augmentation du niveau de l'excitation dans cette boucle pouvait faire basculer le réseau vers le régime gamma et qu'à l'opposé la diminution de ce niveau d'excitation ferait basculer le réseau vers le régime bêta. Nous avons testé la validité de cette hypothèse en mettant au point un protocole de manipulation pharmacologique du niveau d'excitation dans cette boucle mitrale/granule. Toutefois cette étude n'est pas encore complète, il nous reste encore à établir un certain nombre de contrôles avant d'être certains de la validité de nos résultats. Pour cette raison, cette étude pharmacologique n'est pas incluse dans la section résultats ; nous ne présentons ici que des résultats préliminaires, en complément de notre première étude électrophysiologique.

Comme décrit précédemment (voir section 1.3.2), les composantes excitatrices et inhibitrices dans le bulbe olfactif en général et plus particulièrement au niveau de la synapse dendro-dendritique reposent essentiellement sur l'activation des récepteurs glutamatergiques et GABAergiques. Afin de tester s'il est possible de faire basculer le réseau bulbaire du régime gamma vers le régime bêta et inversement en modifiant artificiellement l'importance relative de ces deux composantes, nous avons choisi d'effectuer des injections très locales d'agents agonistes et antagonistes des récepteurs GABAergiques. Pour cela, une pipette est remplie d'une solution diluée de l'agent pharmacologique et accolée à l'électrode d'enregistrement à l'aide d'un micro-manipulateur. L'électrode et la pipette sont ensuite descendues solidairement dans le bulbe olfactif comme décrit dans les résultats présentés plus tôt, dans la couche plexiforme externe. Lorsqu'une position

d'enregistrement convenable est atteinte, une série de six enregistrements, utilisant deux odeurs différentes en alternance, est réalisée et constitue la condition contrôle. La drogue est ensuite administrée par éjection pneumatique à faible pression (10 psi) appliquée pendant deux secondes, suite à quoi seize nouveaux enregistrements sont réalisés avec un intervalle de trente secondes ou une minute entre enregistrements, ils sont donc répartis sur onze minutes suivant l'administration de drogue, puis de nouveaux enregistrements épisodiques sont effectués (15, 20, 30 et 40 minutes après administration) afin de vérifier si un retour à la condition contrôle est obtenu. Nous avons utilisé le muscimol, agoniste spécifique des récepteurs GABA_A, à 20mM et la bicuculline, antagoniste spécifique des récepteurs GABA_A, à 10mM. Les concentrations utilisées sont élevées par rapport à ce qui se rencontre généralement dans la littérature, mais en contrepartie les volumes éjectés sont extrêmement faibles, de l'ordre de quelques dizaines de nL. La figure 3.2 résume les résultats obtenus. L'application de muscimol (Fig. 3.2 A) supprime complètement et immédiatement l'émission de potentiels d'action par les cellules à proximité de l'électrode d'enregistrement, puis abolit progressivement mais rapidement (1–2 minutes) les oscillations des LFP dans la bande gamma ; les oscillations dans la bande bêta étant conservées voire même renforcées.

L'application de bicuculline (Fig. 3.2 B) déclenche une réponse en deux temps, marquée en premier lieu par une disparition complète des oscillations dans les deux bandes de fréquence, une disparition des potentiels d'action et surtout une inversion de la composante lente liée à la modulation respiratoire (cf. figure). Dans un deuxième temps, entre une à deux minutes après application de la drogue, des oscillations extrêmement amples apparaissent dans la bande gamma, tellement amples parfois qu'elles durent en continu sur plusieurs cycles respiratoires. La bicuculline n'abolit pas à proprement parler les oscillations dans la bande bêta, mais celles-ci sont néanmoins absentes lorsque les oscillations gamma deviennent trop durables. Au fur et à mesure des enregistrements, ces oscillations gamma proéminentes disparaissent (8–12 minutes). Les potentiels d'action réapparaissent dans les enregistrements 5 à 7 minutes après l'application de la bicuculline, ce délai correspondant souvent à une réduction de l'amplitude des oscillations gamma, soit parce que la bicuculline se dilue dans le liquide extra-cellulaire, soit parce qu'elle est internalisée par les cellules gliales. L'effet le plus reproductible de l'application de bicuculline reste l'inversion de la modulation respiratoire.

Avec ces résultats, nous confirmons notre supposition sur la balance du réseau entre les deux régimes oscillatoires : le renforcement de la composante excitatrice (par blocage de l'inhibition) fait basculer le réseau dans un régime gamma très puissant ; à l'inverse, le renforcement de la composante inhibitrice (par renforcement de l'inhibition) fait bascu-

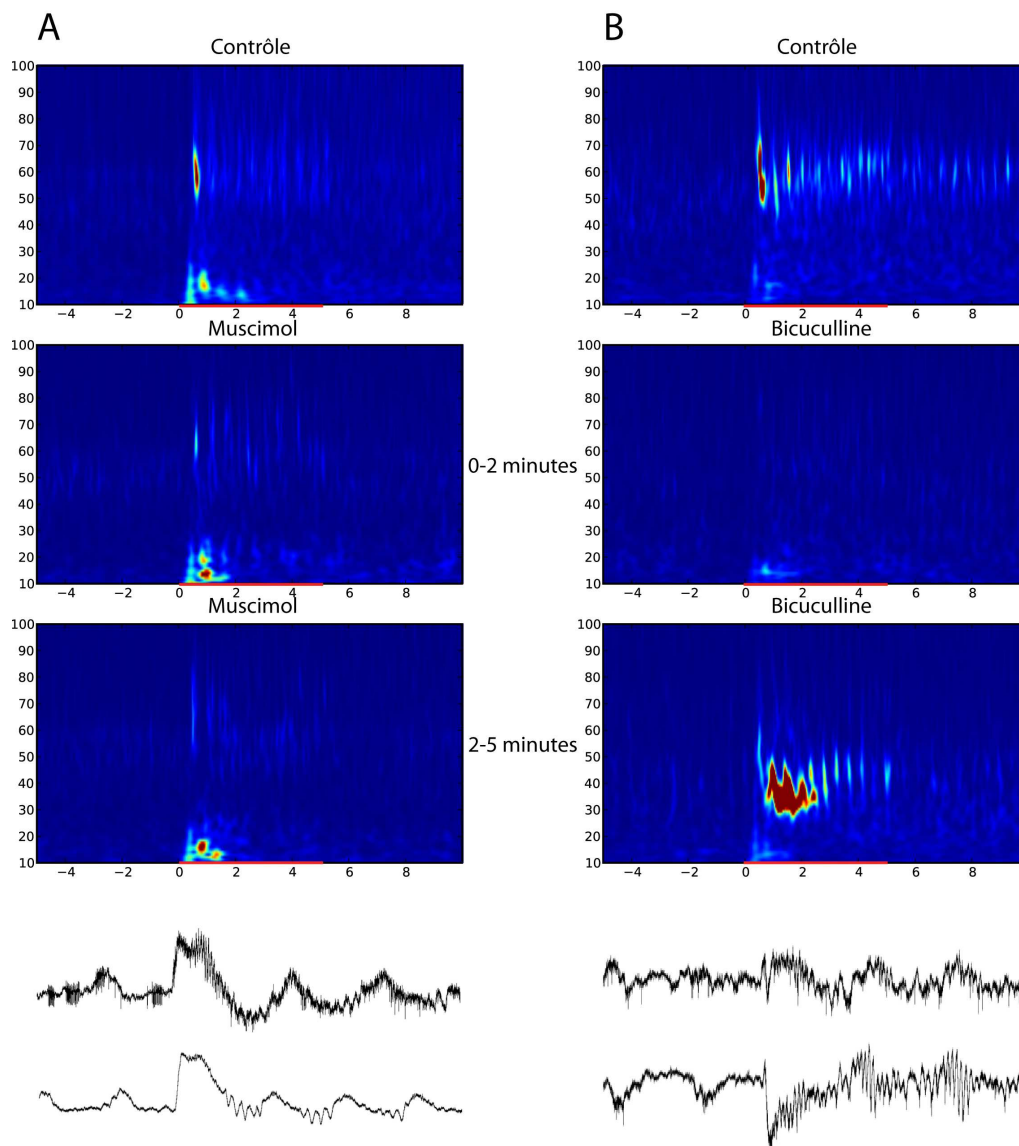


FIG. 3.2: Représentations temps-fréquence de l'activité oscillatoire sous influence d'agents agonistes et antagonistes des récepteurs $GABA_A$.

A : Application locale de Muscimol, agoniste spécifique des récepteurs $GABA_A$, 20mM. De haut en bas : cartes temps-fréquence de l'activité moyennée sur plusieurs enregistrements, en condition contrôle (3 enregistrements), entre 0 et 2 minutes après application de la drogue (2 enregistrements) et entre 2 et 5 minutes après application de la drogue (3 enregistrements), $n=5$ rats pour les 3 cartes. La barre rouge correspond à la stimulation olfactive par l'heptanone (K07). En bas : tracé brut caractéristique des effets observés pendant l'application de la drogue.

B : idem, avec la bicuculline, antagoniste spécifique des récepteurs $GABA_A$, 10 mM, $n=3$ rats.

Source : T. Cenier

ler le réseau dans un régime bêta. Cependant, les résultats trouvés dans la littérature sur le même sujet sont en contradiction avec ceux présentés ici. Sur tranche, une application locale d'un antagoniste GABAergique (SR95531, 50 μM) résulte en une forte diminution de l'amplitude des oscillations dans la bande gamma (Lagier et al., 2004). Sur le cerveau isolé de poisson, les LFP présentent des oscillations dans une seule bande de fréquence, entre 20 et 30 Hz. Le blocage de la transmission GABAergique (gabazine 50–100 μM) abolit totalement ces oscillations (Tabor et al., 2008). Enfin, une étude de modélisation sur le système olfactif de l'insecte montre le rôle essentiel de l'inhibition médiée par les récepteurs GABA_A dans la synchronisation des PN et dans la genèse d'oscillations des LFP (Martinez and Montejo, 2008).

L'explication la plus probable de la différence de nos résultats par rapport à ces travaux est l'état du réseau hors de la zone d'enregistrement. Dans les expériences sur tranche, ce réseau est partiellement limité, d'une part par l'épaisseur de la tranche (300 μm) en comparaison de la longueur des dendrites secondaires des cellules M/T (cf. section 1.3.1) et d'autre part par l'absence des retours corticaux. Dans le cas du poisson, les enregistrements sont réalisés sur un explant du système olfactif baignant dans un liquide céphalorachidien artificiel, et les drogues sont administrées directement dans le bain, entre 10 et 15 minutes avant les enregistrements. De cette façon c'est l'ensemble du bulbe qui sera touché et l'inhibition GABAergique sera abolie dans l'ensemble de la structure. Dans notre expérience, la drogue est administrée très localement et il est possible que dans une majeure partie du bulbe la composante inhibitrice soit inchangée, tout en étant modifiée localement, dans la zone enregistrée. Lors de la stimulation olfactive, les cellules présentes dans la zone d'enregistrement continuent à recevoir des entrées excitatrice et inhibitrices normales, mais avec notre agent pharmacologique, nous donnons localement un «coup de pouce» dans une direction ou l'autre.

3.2 Hypothèses fonctionnelles pour les rythmes rapides et lent

SI NOTRE PREMIÈRE ÉTUDE nous fournit des renseignements sur l'origine de l'alternance entre les deux régimes oscillatoires bêta et gamma, elle ne répond pas à la question des relations temporelles pouvant exister entre ces oscillations et les décharges individuelles des cellules mitrales. L'arrivée d'une oscillation influence-t-elle la décharge

des cellules ? Quelle relation temporelle s'établit-il entre les oscillations et les décharges des cellules au cours des deux différents régimes ? Et comment le rythme lent lié à la respiration interagit-il avec ces régimes rapides ? Dans notre deuxième étude (page 90), nous avons fait le rapprochement entre l'organisation temporelle des phénomènes dynamiques du bulbe olfactif en fonction du cycle respiratoire et une séquence possible d'évènements fonctionnels par rapport à ce même cycle respiratoire.

Les résultats de notre seconde étude montrent que la stimulation olfactive évoque deux régimes d'activités dans le bulbe. Chacune de ces activités correspond à l'apparition d'oscillations des LFP dans une certaine bande de fréquence, par le cadencage partiel mais significatif des activités unitaires dans la même bande de fréquence et enfin par une relation de phase cohérente entre ces deux phénomènes : les potentiels d'action émis apparaissent préférentiellement à une phase particulière des oscillations du LFP. Les différences caractérisant ces deux activités sont d'une part leur bande de fréquence, bêta ou gamma, d'autre part la facilité avec laquelle cette relation de phase pourra s'établir. Nous allons tout d'abord préciser ces différences, puis nous proposerons, en lien avec notre première étude, un mécanisme expliquant le passage d'un régime à l'autre et enfin nous formulerons des hypothèses sur le rôle fonctionnel de ces deux régimes d'activité.

Pendant le régime gamma, les cellules présentant un patron de décharge du type S+ émettent leurs potentiels d'action en concomitance avec les oscillations des LFP dans la bande gamma, mais sans modification notable de leur fréquence de décharge par rapport à l'activité spontanée. Malgré cela, ces cellules vont établir une relation de phase avec les oscillations des LFP. Cela signifie que, si le nombre global de potentiels d'action émis par la cellule ne varie pas, ils seront cependant réarrangés dans le temps, ils seront cadencés à la fréquence de l'oscillation. La figure 3.3 illustre ce cadencage, la gamme de fréquence instantanée des neurones se resserre avec l'arrivée des bouffées d'oscillations gamma (3.3A), la fréquence moyenne de décharge est d'environ 100 Hz avant l'oscillation, elle descend à environ 60 Hz pendant la bouffée d'oscillation.

Afin de comprendre les mécanismes derrière ce cadencage, François David, alors doctorant dans l'équipe, a réalisé un modèle du bulbe olfactif¹, en partie basé sur nos données électrophysiologiques et intégrant les résultats publiés par Lagier et al. (2004). Très brièvement, les cellules M/T reçoivent un courant inhibiteur oscillant, en provenance des cellules granulaires du réseau et cette composante oscillante peut entrer en interaction

¹François David a soutenu sa thèse devant l'université Lumière, Lyon 2, le 8 juin 2007. Les travaux mentionnés ici font l'objet d'une publication, en cours de révision auprès de PLoS Computational Biology.

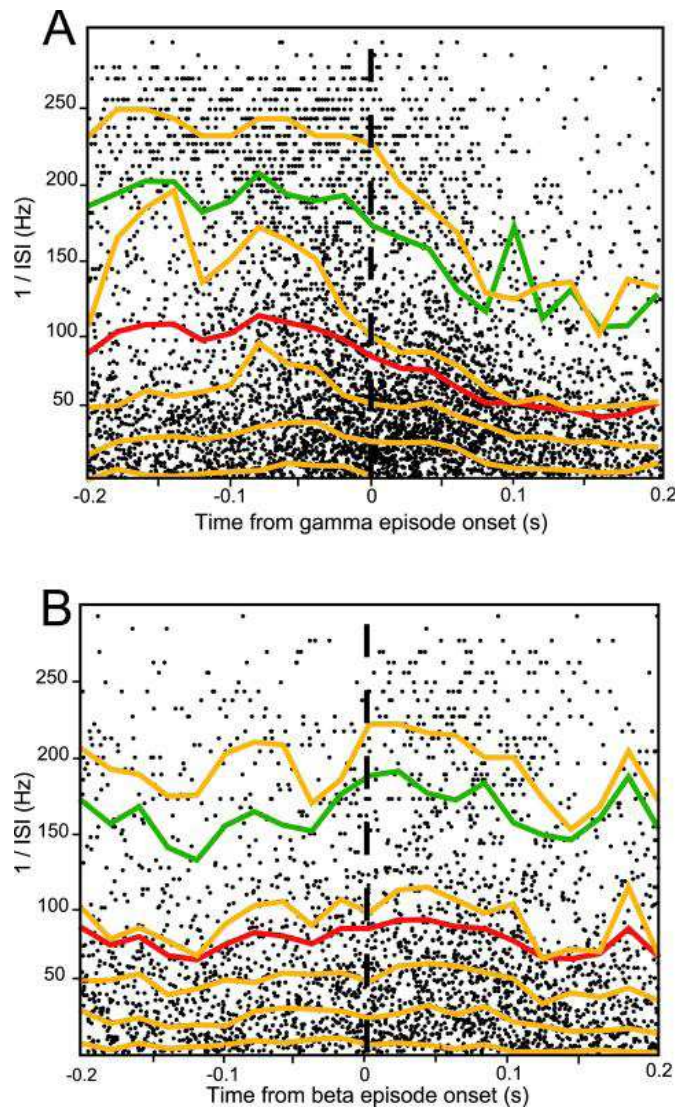


FIG. 3.3: Fréquence instantanée des cellules M/T avant et pendant les bouffées d'oscillation

A : Abscisse : temps par rapport au début de l'oscillation dans la bande gamma (barre pointillée). Ordonnée : fréquence instantanée de décharge des cellules individuelles, exprimée en Hz. Cette fréquence est obtenue en calculant l'inverse de la moyenne des intervalles entre deux potentiels d'action (ou ISI, inter-spike interval) sur 5 ms. Courbe rouge : fréquence moyenne sur l'ensemble des cellules. Courbe verte : variance. Courbes orange : distribution des fréquences en percentiles, de 10 à 90%, par pas de 20%. Ces courbes sont calculées sur un bin de 20 ms. $n=1104$ bouffées d'oscillations gamma

B : Idem, pendant les épisodes d'oscillations bêta. $n=587$

Source : T. Cenier, F. David et N. Buonviso

avec l'oscillation du réseau (cf. annexe page 143). Le résultat de cette interaction est un entraînement des neurones par l'oscillation. L'entraînement se définit comme étant la capacité d'une oscillation à forcer la décharge d'un neurone à suivre un motif spécifique et reproductible, autrement dit à émettre à une phase spécifique de cette oscillation. François David a également montré que l'efficacité de l'entraînement est conditionnée par deux critères : la fréquence de l'oscillation f_o et la gamme de fréquence instantanée de décharge des cellules entraînées $f_1 - f_2$. Plus l'entraînement est efficace, plus la gamme de fréquence de décharge des cellules entraînées $f_1 - f_2$ sera large. L'efficacité maximum pour une valeur de f_o proche de 60 Hz. La première conclusion à tirer de cela est que le régime gamma, correspondant à des valeurs de f_o entre 40 et 80 Hz, sera particulièrement propice à la formation d'assemblées de neurones. La deuxième conclusion est que les assemblées de neurones formées pendant le régime gamma seront très permissives, c'est à dire peu regardantes quant à la fréquence instantanée des neurones recrutés. Le modèle de François David indique une gamme $f_1 - f_2$ large de 60 Hz pour $f_o = 60$ Hz, nos données montrent un phasage des potentiels d'action sur les oscillations des LFP dans le régime gamma pour une gamme de fréquence entre 20 et 80 Hz. Les conséquences fonctionnelles de cette permissivité seront discutées plus loin.

La différence principale entre le régime bêta et le régime gamma, outre leur fréquence bien sûr, est la difficulté qu'il y a cette fois à établir la relation de phase entre oscillations des LFP et activités unitaires. D'une part, nos données montrent que la gamme $f_1 - f_2$ pour lesquelles cette relation est possible est restreinte, entre 10 et 30 Hz, de plus l'apparition de la bouffée d'oscillations au régime bêta reste sans effet sur la fréquence instantanée des cellules mitrales (cf. Fig. 3.3B). D'autres part, le modèle de François David ne montre pas l'existence d'un entraînement pour f_o entre 10 et 30 Hz. La conclusion ici est que les assemblées de neurones formées pendant le régime bêta seront beaucoup plus restrictives que pendant le régime gamma, en tous cas, elle ne repose pas sur un mécanisme d'entraînement des neurones par le réseau. Les conséquences fonctionnelles de cette restrictivité seront discutées plus loin.

Nous avons détaillé les deux régimes d'activité bulbaire évoqués par la stimulation olfactive, nous allons maintenant aborder le mécanisme permettant le passage d'un régime d'activité à l'autre. La respiration est une composante indissociable de la modalité respiratoire chez les vertébrés terrestres. Le flux et le reflux des molécules dans la cavité nasale module l'amplitude du message olfactif transmis au bulbe (Chaput, 2000) et le niveau d'excitation d'un glomérule variera conjointement avec la phase du cycle respiratoire (Spors et al., 2006). D'autre part, les afférences au bulbe sont organisées spatialement

en fonction de la spécificité des récepteurs olfactifs. En conséquence, le bulbe olfactif alterne en permanence entre un état d'excitation spatialisée et forte (maximum à la transition entre inspiration et expiration) et un état de faible excitation (phase d'expiration).

Dans notre première étude et dans les travaux pharmacologiques qui en ont découlé, nous montrons que la bascule entre le régime gamma et le régime bêta dépend de la balance entre une composante excitatrice et une composante inhibitrice dans le réseau. Dans notre seconde étude, nous mettons en relation l'apparition des régimes gamma et bêta avec la phase du cycle respiratoire, le régime gamma apparaît au moment de la transition inspiration/expiration, le régime bêta apparaît pendant l'expiration ou au début de l'inspiration suivante. Nous proposons donc que la respiration, en modulant le niveau de l'excitation afférente sur le bulbe, contrôle l'alternance entre les deux régimes, selon un enchaînement de conséquences résumé par la figure 3.4. À la transition inspiration/expiration, les glomérules vont être faiblement ou fortement activés, selon un schéma spatial dépendant des caractéristiques chimiques des odeurs. On distingue alors deux catégories de cellules M/T, celles qui sont reliées à un glomérule fortement activé (en rouge sur la figure), et celles qui sont reliées à un glomérule faiblement activé (en bleu). Les cellules dans la première catégorie présenteront le patron de décharge S+ (émission de AP à la transition inspiration/expiration). Cette forte activité va, d'une part faire basculer le réseau vers le régime gamma, et d'autre part réduire les cellules de la deuxième catégorie au silence par le biais de l'inhibition latérale. Enfin, le message efférent ira activer les cellules pyramidales du cortex piriforme.

Ensuite, à la phase d'expiration (voire pendant le début du cycle respiratoire suivant), le message sensoriel afférent sera très diminué en intensité. Les cellules de la deuxième catégorie ne sont plus inhibées par leurs voisines présentent donc alors le patron de décharge type S- (émission de AP pendant l'expiration). Dans le même temps, l'activité corticale augmente le niveau de la composante inhibitrice dans le bulbe, faisant basculer le réseau vers le régime bêta.

Selon ce principe, l'appartenance d'une cellule M/T à une assemblée gamma ou bêta, est finalement pré-déterminée par son patron de décharge S+ ou S-, qui est lui-même déterminé par la carte spatiale de l'activité glomérulaire. Pour résumer simplement, une forte activité glomérulaire entraîne une activité cellulaire selon un patron de type S+ et la formation d'assemblées de neurones au régime gamma ; une faible activité glomérulaire entraîne une activité cellulaire selon un patron de type S- et la formation d'assemblées de neurones au régime bêta.

Les deux régimes bêta et gamma sont marqués par des oscillations des LFP et par un

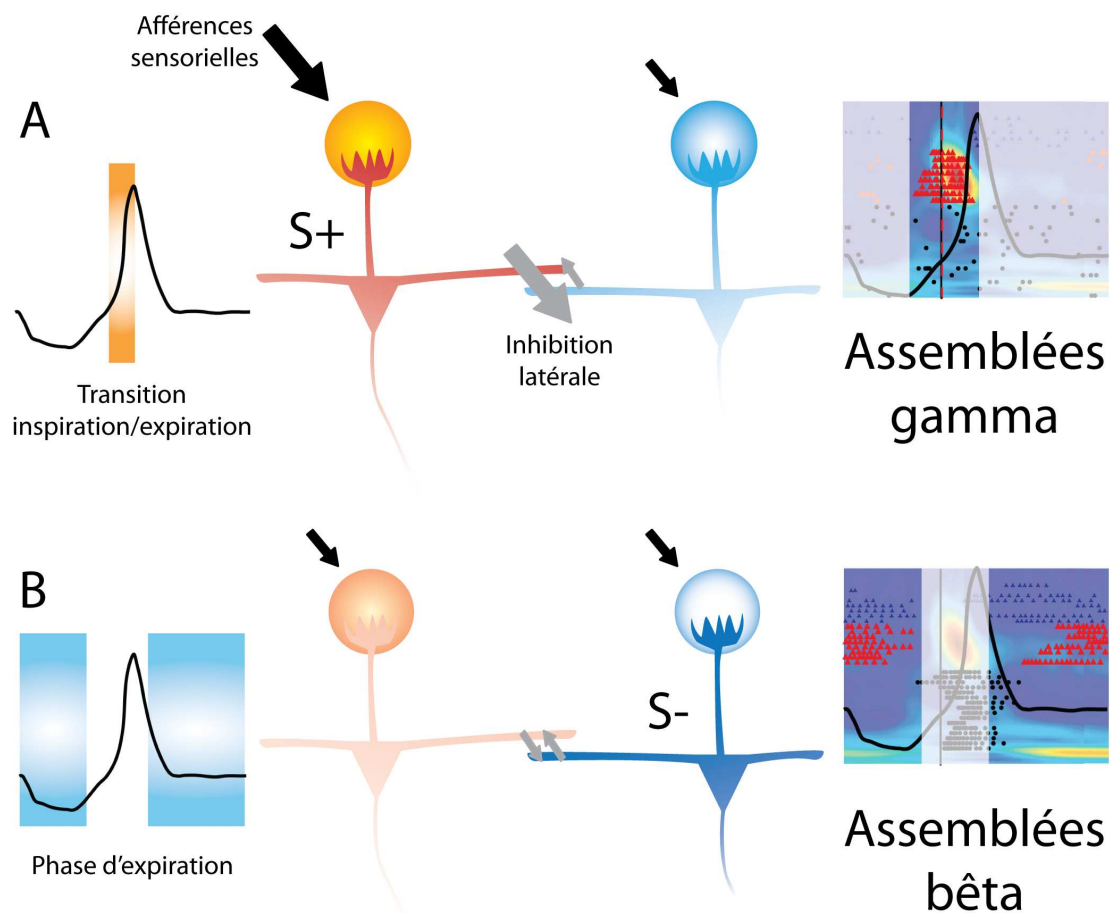


FIG. 3.4: Alternance des assemblées de neurones gamma et bêta selon le niveau d'excitation afférente modulé par le cycle respiratoire.

A : À la transition inspiration/expiration : formation des assemblées gamma.

À gauche : Phase du cycle respiratoire. Au centre : Représentation schématique de deux cellules mitrales, l'une connectée à un glomérules fortement activé, en rouge, l'autre connectée à un glomérule faiblement activé, en bleu. Les flèches noires indiquent le niveau de l'afférence sensorielle, les flèches grises indiquent le niveau de l'inhibition latérale par l'intermédiaire des cellules granulaires. À droite : Organisation temporelle des événements dynamiques : représentation phase-fréquence des oscillations des LFP (abscisse : phase du cycle respiratoire, ordonnée : fréquence de 10 à 100 Hz) et raster-plot des activités unitaires (abscisse : phase respiratoire, ordonnée : cycles successifs de bas en haut), les symboles rouges correspondent aux activités unitaires pendant la stimulation olfactive, la barre verticale indique la transition inspiration/expiration.

B : Idem, pendant l'expiration ou le début du cycle suivant : formation des assemblées bêta.

Source : T. Cenier.

niveau significatif de cohérence entre LFP et activités unitaires. Suivant les principes exposés dans la section 1.5.3 nous proposons que ces régimes correspondent à la formation d'assemblées dynamiques de neurones. Ces assemblées apparaissent de façon alternée, selon le niveau d'activité afférente, contrôlé par la respiration. Les différences constatées entre les deux régimes suggèrent quant à elles qu'il s'agit d'assemblées de neurones servant des fonctions différentes, ainsi que nous allons l'exposer.

Les assemblées dynamiques de neurones formées pendant le régime gamma permettraient la représentation de l'information olfactive en provenance de l'épithélium. Les arguments en faveur sont au nombre de cinq.

1. Les molécules présentes dans la cavité nasale activent une combinaison spécifique de récepteurs olfactifs et cette combinaison est projetée sur la couche glomérulaire du bulbe olfactif selon un plan d'organisation spatial (mais aussi vraisemblablement temporel, cf. section 1.5.6, page 71), cette projection atteint son maximum d'activation à la transition inspiration/expiration.
2. Cette représentation spatiale est convertie en une représentation spatio-temporelle par la synchronisation spécifique de neurones bulbaires, organisée par l'activité rythmique gamma du réseau grâce à un vrai mécanisme d'entraînement. La conséquence fonctionnelle de cet entraînement et de sa permissivité est que le régime gamma recrute un grand nombre de cellules dans les zones du bulbe activées par le message afférent, assurant ainsi un niveau de transmission suffisamment élevé pour activer les cellules pyramidales du cortex piriforme.
3. Plusieurs résultats expérimentaux montrent que le régime gamma dans le cortex piriforme est initié par le régime gamma dans le bulbe olfactif (Neville and Haberly, 2003; Martin et al., 2006), suggérant une projection de l'activité du dernier vers le premier.
4. Les propriétés intrinsèques des cellules pyramidales du cortex piriforme leur confère un rôle d'intégrateur de l'activité afférente et les met donc en bonne position pour «lire» ce qui sera transmis par les assemblées de neurones formées dans le bulbe.
5. À cette même phase respiratoire, le cortex piriforme est également marqué par des phénomènes dynamiques dans la bande gamma : pic d'activité des cellules pyramidales, oscillations gamma dans les LFP et cohérence de phase entre les oscillations gamma et les potentiels d'action (Litaudon et al., 2008) suggérant que dans cette structure se forment à leur tour de nouvelles assemblées de neurones pour représenter l'information en provenance du bulbe.

Les assemblées dynamiques de neurones formées pendant le régime bêta correspondraient à une phase de dialogue entre le bulbe olfactif et le cortex piriforme, permettant à court terme l'évolution de la qualité de la représentation spatio-temporelle (cf. section 1.5.5, page 67) et à plus long terme la mise en place des phénomènes de plasticité bulbaire. Ici encore, un certain nombre d'arguments nous permettent d'appuyer cette hypothèse.

1. Les oscillations bêta sont le fruit du fonctionnement d'un circuit bulbo-cortical (Neville and Haberly, 2003; Martin et al., 2006). L'interruption des voies de communication entre les deux structures abolit totalement les oscillations bêta.
2. Les assemblées de neurones formées pendant le régime bêta sont plus restreintes (puisqu'elles ne concernent que les cellules dont la fréquence instantanée est comprise entre 10 et 30 Hz), ce résultat est délicat à interpréter avec les données que nous possédons, mais nous pouvons suggérer que les fréquences entre 10 et 30 Hz correspondent à des cellules plutôt hyperpolarisées, ce qui pourrait correspondre à des cellules recevant une inhibition forte provenant de cellules granulaires activées par les retours centrifuges. En conséquence, dans le cas du régime bêta, la participation d'une cellule à une assemblée ne reflète pas tant sa localisation sur la carte spatiale évoquée par l'activité afférente que son degré d'implication dans le dialogue bulbo-cortical.
3. La suppression par la gabazine de la composante inhibitrice que nous avons mis en lien avec le régime bêta, supprime la réorganisation de l'activité bulbaire à court terme Tabor et al. (2008).
4. Les modifications dans l'organisation spatiale (Freeman and Schneider, 1982; Freeman and Skarda, 1985) et temporelle (Martin et al., 2004, 2006) des oscillations des LFP, particulièrement dans la bande bêta, reflètent des phénomènes cognitifs d'apprentissages suite à un conditionnement, mettant en jeu un réseau important de structures corticales, dont le cortex piriforme.
5. Le circuit bulbo-cortical associé au régime bêta met en jeu la couche granulaire du bulbe, couche associée aux phénomènes de plasticité bulbaire en général, y compris la neurogénèse (Altman, 1969; Sallaz and Jourdan, 1996; Alonso et al., 2006; Lledo et al., 2006) et que les voies de projection centrifuge en provenance du cortex piriforme sont elles-mêmes directement impliquées dans ces phénomènes de plasticité bulbaire (Gao and Strowbridge, 2009; Nissant et al., 2009).

Pour résumer, le régime gamma marquerait un temps d'analyse et de transmission de l'information olfactive en provenance de l'appareil sensoriel olfactif, le régime bêta correspondrait à une réorganisation du fonctionnement du bulbe olfactif permettant soit une

adaptation immédiate du système à une tâche en cours, soit une modification du réseau résultant du traitement cognitif des informations perçues. Le basculement d'un régime à l'autre dépendrait d'une balance entre la composante inhibitrice et la composante excitatrice dont l'alternance serait contrôlée par le déroulement du cycle respiratoire.

3.3 Anesthésié versus vigile

UNE DES PRINCIPALES CRITIQUES pouvant être formulée sur le travail présenté ici est que nous travaillons sur un modèle anesthésié et donc éloigné des conditions physiologiques et écologiques normales du fonctionnement du système olfactif. Et en effet, par exemple, l'organisation temporelle des oscillations que nous décrivons est radicalement différente de ce qui a été décrit chez le rat en comportement (Martin et al., 2004, 2006).

Chez le rat vigile effectuant une tâche de discrimination olfactive, l'activité basale du bulbe olfactif est marquée par une forte prédominance des oscillations gamma, ces oscillations diminuent fortement en amplitude lorsque l'animal va échantillonner une odeur qui lui est délivrée et qu'il devra apprendre à associer avec un comportement. Une fois que cet apprentissage est acquis, la phase d'échantillonnage de l'odeur est marquée par une diminution encore plus nette des oscillations gamma et une forte augmentation d'amplitude des oscillations dans la bande bêta. Ainsi, avec une absence d'alternance bêta/gamma pendant le cycle respiratoire, des oscillations gamma en absence de stimulation olfactive prononcée et des oscillations bêta pendant l'échantillonnage actif de l'odeur, l'animal vigile constitue en effet un tableau bien différent du nôtre.

Une explication possible de ces différences repose sur la suppression, chez l'animal anesthésié, des systèmes neuromodulateurs. Ainsi par exemple, l'anesthésie à l'uréthane abolit la modulation cholinergique dans le bulbe olfactif (Tsuno et al., 2008). Or, ces systèmes sont impliqués dans le contrôle des états cognitifs de l'animal et peuvent avoir une forte influence sur le fonctionnement du réseau. Par exemple, une étude par Castillo et al. (1999) montre que l'acétylcholine dans le bulbe a un double effet, excitateur sur les cellules M/T et inhibiteur sur les cellules granulaires résultant au final en un renforcement de la composante excitatrice dans le bulbe. Or, la modulation cholinergique est connue pour représenter l'état global de vigilance de l'animal (Buzsàki and Gage, 1989; Pepeu

and Blandina, 1998). Une interprétation libre de ces résultats est que l'animal soumis à un protocole expérimental de comportement se trouve dans un état de vigilance élevée, donc soumis à une forte modulation cholinergique correspondant à une composante excitatrice très renforcée ; le bruit de fond olfactif serait alors suffisant pour faire basculer le réseau bulbaire vers un régime gamma. Lors de l'échantillonnage de l'odeur, la plasticité induite par l'apprentissage de la tâche aura pour effet une composante inhibitrice très renforcée, faisant basculer le réseau bulbaire vers un régime bêta, ou plus simplement le régime bêta pourrait accompagner, chez l'animal vigile, l'évocation du souvenir olfactif lié à l'odeur apprise.

Une autre différence fondamentale entre le rat vigile et le rat anesthésié est sa respiration. Tandis que le rat anesthésié respire lentement (2 Hz) et régulièrement, la respiration chez l'animal vigile varie fortement et de façon chaotique en amplitude et en fréquence (voir figure 3.5) (Wesson et al., 2008). D'un point de vue écologique ce para-

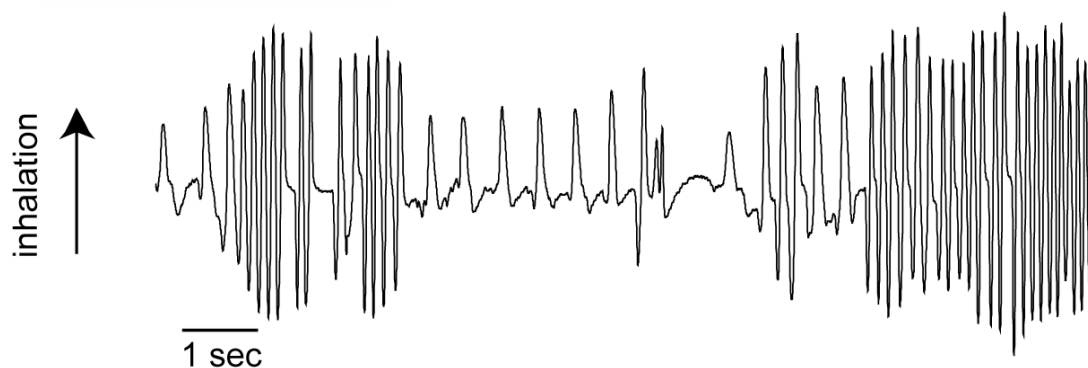


FIG. 3.5: Enregistrement de la respiration chez le rat en comportement exploratoire non contraint et non dirigé.

Source : Wesson et al. 2008.

mètre est évidemment très important puisqu'il permet à l'animal un contrôle actif sur sa manière d'échantillonner son environnement olfactif. Traditionnellement, le passage à une fréquence respiratoire élevée est associé à un comportement d'exploration (Macrides et al., 1982; Youngentob et al., 1987) et permet notamment l'analyse d'une source odorante en particulier en faisant abstraction d'un bruit de fond olfactif élevé (Verhagen et al., 2007).

Lorsque l'odeur est associée à un renforcement dans le cadre d'une tâche comportementale, après apprentissage de la tâche, l'animal sera capable d'identifier l'odeur en une inspiration et se concentrera alors sur la tâche qu'il doit effectuer, sans modifier sa fré-

quence respiratoire (Wesson et al., 2008). La différence de comportement respiratoire entre le modèle vigile et anesthésié peut également expliquer la différence entre les signaux enregistrés dans les deux situations. Lors d'inspirations très rapprochées et de grande amplitude, la cavité nasale sera saturée par l'odeur et le signal afférent au bulbe aura une intensité élevée, avec pour résultat un bulbe au rythme gamma. Dans le cas d'une odeur apprise, la respiration restera lente et, passée la première inspiration nécessaire à l'identification, la combinaison de l'intensité afférente modérée et de forts retours corticaux liés à la valence de l'odeur peut être la cause d'un bulbe maintenu à un rythme bêta. Nous avons montré le rôle du rythme respiratoire dans l'organisation de la dynamique bulbaire chez le rat anesthésié, une étude semblable chez l'animal vigile compléterait avantageusement nos résultats afin de comprendre plus finement le rôle central de la respiration dans l'organisation de l'activité du réseau bulbaire.

Toujours est-il que nous ne prétendons pas utiliser nos résultats obtenus sur un modèle anesthésié pour expliquer ce qui se passe chez l'animal vigile. Notre modèle permet d'étudier le réseau bulbaire dans un état pseudo-isolé, c'est-à-dire n'étant pas soumis à autre chose que des afférences sensorielles et un rétro-contrôle cortical, ce dernier étant peut-être même limité par rapport au vigile. Nous étudions les rouages du système, ses constituants, la façon dont les différents phénomènes dynamiques s'articulent entre eux. L'étude de l'animal vigile permet de comprendre comment ces différents rouages s'entraînent les uns et les autres. L'utilisation complémentaire des deux approches est donc nécessaire pour obtenir une vision intégrée de l'ensemble du fonctionnement du système olfactif.

3.4 Conclusion générale

A PRÈS AVOIR DÉVELOPPÉ des outils adaptés à l'analyse des signaux enregistrés dans le bulbe olfactif du rat anesthésié respirant librement en réponse à une stimulation olfactive, nous avons montré que les oscillations rapides des LFP dans le réseau bulbaire correspondaient à deux étapes différentes du traitement de l'information olfactive. Nous avons montré que ces oscillations s'accompagnent d'un ensemble de phénomènes dynamiques formant un support à la formation d'assemblées de neurones à deux régimes fréquentiels différents, l'un à la fréquence gamma permettant la représentation de l'infor-

mation olfactive afférente, l'autre, à la fréquence bêta, reflétant le dialogue entre le bulbe olfactif et le cortex piriforme afin d'affiner la représentation de l'information. Nous avons mis en évidence le rôle majeur de la respiration en tant que rythme lent, organisateur de l'activité de la structure et permettant l'alternance des deux régimes oscillatoires et donc des assemblées de neurones correspondantes. Nous en concluons que les oscillations du réseau bulbaire sont associées à une variété de mécanismes fonctionnels essentiels pour la représentation efficace de l'information sensorielle olfactive.

Au delà de l'intérêt que représentent ces travaux dans le cadre de l'étude du système olfactif, nous contribuons également à l'avancée dans le problème plus global de la représentation de l'information dans l'encéphale. Nous apportons des éléments expérimentaux en faveur de l'existence d'assemblées de neurones dans la représentation d'une information sensorielle. Nous proposons que le mécanisme au cœur de la formation de ces assemblées est partagé entre plusieurs circuits neuronaux et que chacun de ces circuits engage le système dans une tâche fonctionnelle particulière. Nous formulons l'hypothèse qu'une oscillation lente, la respiration, joue le rôle de régisseur général de ces représentations en organisant dans le temps la formation des assemblées. Si ces hypothèses venaient à être prouvées expérimentalement, nous aurions alors une preuve éclatante de la souplesse et de la puissance du système nerveux central.

Cet ouvrage s'ouvre sur un personnage clef dans l'histoire de l'étude du système olfactif, et il nous a semblé pertinent de le refermer sur un autre personnage, tout aussi fondateur. Gordon Shepherd, voir figure 3.6, dans une revue intitulée «La doctrine neuronale, une révision du concept fonctionnel» revient sur les conséquences conceptuelles de la découverte, qu'il partage avec Wilfrid Rall, de la synapse dendro-dendritique réciproque et son rôle fonctionnel dans la genèse des oscillations des potentiels de champs dans le réseau bulbaire. La pensée qu'il exprime peut se résumer comme suit :

« Ramon y Cajal a montré au début du XX siècle que l'unité de base constituante du système nerveux central était le neurone. En détaillant cette cellule et en faisant coller un rôle fonctionnel à chaque détail morphologique, il allait grandement contribuer à l'établissement de la doctrine neuronale, faisant un amalgame puissant entre les concepts d'unité morphologique et d'unité fonctionnelle. Selon cette doctrine classique, l'unité fonctionnelle du système nerveux central se doit :

- de posséder des dendrites, un corps cellulaire et un axone,
- de présenter une polarité fonctionnelle

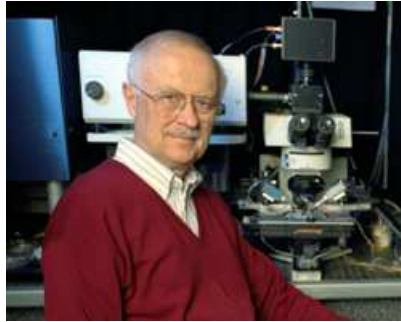


FIG. 3.6: Pr. Gordon M. Shepherd, 1933-

- de pouvoir s’associer en chaîne pour former des voies de propagation de l’information.

Depuis ce temps, la découverte de nombreuses exceptions aux règles édictées nous force à reconsidérer la nature de l’unité fonctionnelle du cerveau. Le bulbe olfactif à lui tout seul contient des contradictions à ces trois règles

- les cellules granulaires ne comportent pas d’axone
- les potentiels d’action dans les cellules mitrales se propagent vers les terminaisons axonales mais aussi vers les terminaisons dendritiques
- l’arborisation dendritique des cellules mitrales et granulaires sert à la fois à l’émission et à la réception de l’information.

Il faut alors dissocier l’unité fonctionnelle de l’unité morphologique. Il faut considérer comme unité fonctionnelle non pas une cellule seule mais le circuit formé par les cellules nécessaires à l’accomplissement d’une tâche de traitement de l’information.» (Shepherd, 1972a)

En conclusion du travail présenté ici, nous rejoignons la pensée de Gordon Shepherd, en affirmant que la capacité de représentation de l’information du système nerveux central n’est pas limitée au nombre de neurones qu’il contient, mais au nombre de combinaisons et de circuits neuronaux qui peuvent s’y former. On sait déjà qu’un neurone dans un réseau peut participer à un très grand nombre d’assemblées de neurones. Ici, nous montrons que l’état du réseau peut conférer des rôles fonctionnels distincts à ces assemblées de neurones pourtant basées sur un mécanisme commun, ce qui accroît encore la souplesse, la robustesse et la puissance des systèmes de représentation de l’information dans le système nerveux central. L’état du réseau est placé sous la direction d’un rythme

lent, ici la respiration, qui fait basculer le système entre deux circuits et donc les assemblées entre deux états fonctionnels. Les oscillations des LFP sont les indicateurs, sinon les acteurs, du fonctionnement de ces différents circuits.

ANNEXES

A Articles de méthode

Respiratory cycle as time basis: An improved method for averaging olfactory neural events

Stéphane G. Roux^a, Samuel Garcia^b, Bernard Bertrand^b, Tristan Cenier^b,
Michel Vigouroux^b, Nathalie Buonviso^b, Philippe Litaudon^{b,*}

^a *Laboratoire de Physique, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon cedex 07, France*

^b *Neurosciences et Systèmes Sensoriels, Université Lyon I-CNRS, 50 Avenue Tony Garnier, 69366 Lyon cedex 07, France*

Received 20 May 2005; received in revised form 2 September 2005; accepted 2 September 2005

Abstract

In the mammalian olfactory system, neural activity appears largely modulated by respiration. Accurate analysis of respiratory synchronized activity is precluded by the variability of the respiratory frequency from trial to trial. Thus, the use of respiratory cycle as the time basis for measuring cell responses was developed about 20 years ago. Nevertheless, averaging oscillatory component of the activity remains a challenge due to their rhythmic features. In this paper, we present a new respiratory monitoring setup based on the measurement of micropressure changes induced by nasal airflow in front of the nostril. Improvements provided by this new monitoring setup allows automatic processing of respiratory signals in order to extract each respiratory period (expiration and inspiration). The time component of these periods, which can differ from trial to trial, is converted into a phase component defined as $[-\pi, 0]$ and $[0, \pi]$ for inspiration and expiration, respectively. As opposed to time representation, the phase representation is common to all trials. Thus, this phase representation of the respiratory cycle is used as a normalized time basis permitting to collect results in a standardized data format across different animals and providing new tools to average oscillatory components of the activity. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Rat; Olfaction; Respiratory monitoring; Time–frequency analysis; Data averaging

1. Introduction

In terrestrial vertebrates, olfactory perception depends on respiration. Olfactory receptors are situated in the nasal cavity and odor molecules must be transported by the inhaled air to evoke a response. As far back as the very first electrophysiological works, the powerful influence of breathing was noticed in the olfactory bulb (OB) and olfactory cortex (OC). Already Adrian (1950) had pointed out that the velocity of the air through the nose was the principal factor in determining what he called “induced waves” in OB and cortex. He observed that such a rhythmic activity appeared at each inspiration. Respiratory modulation of electro-encephalographic (EEG) and local field potential (LFP) signals has been extensively described in OB and OC (Boudreau and Freeman, 1963; Buonviso et al., 2003; Fontanini et al., 2003; Freeman, 1975, 1983; Freeman and Schneider, 1982). Such a respiratory modulation

has also been described in cell unitary activities in the OB mitral/tufted (Chaput, 1986; Chaput and Holley, 1980; Macrides and Chorover, 1972; Mair, 1982; Onoda and Mori, 1980; Pager, 1985; Walsh, 1956) and was recently described in the piriform cortex (PC) (Litaudon et al., 2003; Wilson, 1998). Rather than a variation in overall firing frequency, odor-evoked cell responses have often been reported as a temporal reorganization of their discharges into inhalation-related bursts of spikes. Respiratory cycle-triggered raster plots were used to classify response patterns as a function of the respiratory activity (Buonviso et al., 1992, 2003; Chaput et al., 1992; Litaudon et al., 2003; Wilson, 1998) and the inhalation/exhalation transition period appeared as a crucial time-window for both OB and cortical activity. All these data emphasize the rhythmic features of both LFP oscillatory activity and cell unitary discharges and their variability in the course of the respiratory cycle. A representation of the average unitary activity during the whole respiratory cycle does not take into account these features. Conversely, an accurate evaluation of the cell response requires a separate processing of the inspiration and expiration-related activity (Chaput and Holley, 1980). Recent data support the hypothesis that the respiratory

* Corresponding author. Tel.: +33 4 37 28 74 61; fax: +33 4 37 28 76 01.
E-mail address: litaudon@olfac.univ-lyon1.fr (P. Litaudon).

modulation itself could carry some information about the odor. Indeed, odorant stimulation has been shown to induce a respiration synchronized activation at the glomerular level whose amplitude, phase and spatial distribution are modulated in an odor-specific manner (Spors and Grinvald, 2002). Thus, odor identity and concentration are represented by spatio-temporal patterns, and the respiratory cycle might serve a role in reformatting spatially organized olfactory inputs (Margrie and Schaefer, 2003).

Thus, it appears necessary to take into account the time course of the respiratory cycle in different phases in order to analyze and average olfactory neural events. Such analysis needs accurate breathing recordings which can be carried out through different methods: airflow measurement (Johnson et al., 2003), temperature fluctuations (Chaput and Holley, 1980; Macrides et al., 1982) and piezoelectric monitoring of respiration associated chestwall movement (Wilson, 1998). The choice of a method depends on the respiratory variable that has to be evaluated (airflow, volume, time course, frequency, ...). Since our aim is to study precise temporal relationship between neural activity and respiratory activity in anesthetized animal, we focus on analyzing accurately the respiratory cycle time course with a particular concern to the detection of period changes. Therefore, respiratory sensors must present several compulsory features. First, the bandwidth must be adapted to the respiratory fluctuation frequency; second, hysteresis must be limited to avoid jitter; third, response latency must be as low as possible for the phase shift to be as small as possible. In this paper, we describe a respiratory monitoring setup based on a bidirectional airflow sensor. This setup allows accurate recording of inhalation and exhalation phases, in naturally breathing anesthetized rat, without phase shift.

Averaging olfactory neural events, particularly oscillatory activity, is a challenge due to their rhythmic features. Usually, in other sensory systems, the stimulus onset of each trial is used as the time-zero reference point for data averaging. In the olfactory system, even using short stimulation, successive respiratory cycles occur during odor presentation. Thus, each respiratory cycle can be considered as a trial, and the start of inhalation period defines the time-zero reference point. Unfortunately, some fluctuations in the respiratory cycle duration arise from cycle to cycle inducing jitter in latency and making it impossible to directly average neither raw signals nor time–frequency maps as in other sensory systems (Tallon-Baudry et al., 1998). In this paper, we describe an improved method to split the respiratory cycle into its different components (inhalation, exhalation) and to transform the time component (which differed from cycle to cycle) into a phase component which is constant for all trials. This phase representation of the respiratory cycle is used as a normalized time basis to average olfactory neural events.

2. Respiration monitoring and processing

2.1. Respiratory monitoring setup

This setup is designed to record respiration in the freely breathing anesthetized rat. Since our aim is to get an accurate

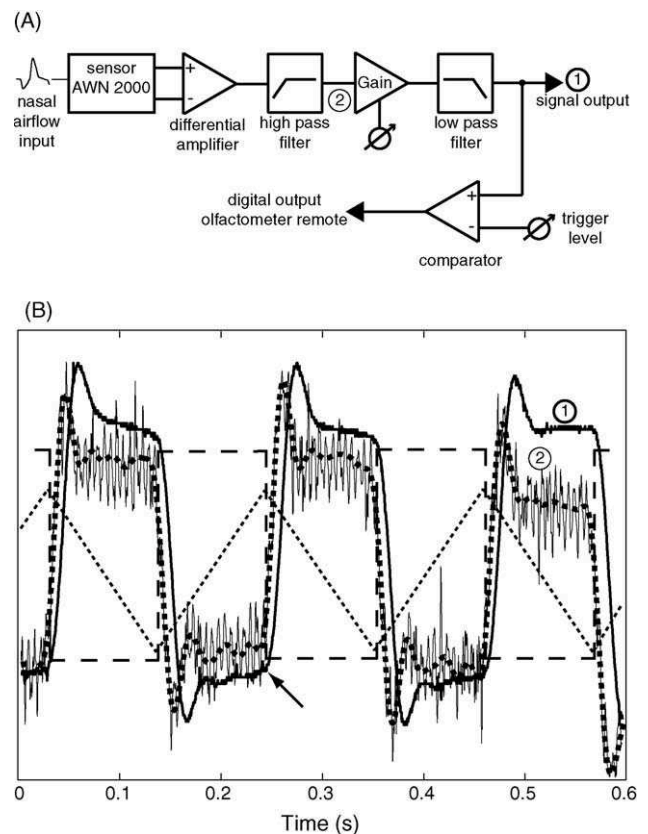


Fig. 1. (A) Schematic diagram of the electronic setup. The detected respiratory signal is high pass filtered (0.1 Hz) to avoid signal offset, amplified (with adjustable gain) and low pass filtered (30 Hz). A digital output is connected to the olfactometer; odor onset is triggered at the end of the rising phase of the expiratory period. (B) Respiratory monitoring setup test. Dotted thin line: 4.7 Hz loudspeaker electrical triangle input. Dashed line: loudspeaker theoretical pressure square output. Solid thin line: signal output before low pass filter (2). Dotted thick line: offline low pass (50 Hz) digital filtering of non-filtered signal ("filtfilt.m" Matlab function and filter designed with FIR function). Solid thick line: monitoring setup signal output (1). Different signals were normalized to be directly compared. If the slope of the signal is slightly modified by low pass filtering, the reaction time to airflow direction change remains negligible (arrow).

image of the different respiratory cycle periods and particularly their transition epochs, this recording setup is designed to quickly react to nasal airflow direction change. A direct measurement of nasal airflow is a challenge in small animal due to technical considerations: airtightness around the nostril should be total; dead volume should be as small as possible to avoid asphyxia. Moreover, such a monitoring setup makes it difficult to deliver odor stimulation and eliminate residual odor. Therefore, we chose to measure micropressure changes induced by nasal airflow in front of the nostril. The respiratory monitoring setup is described in Fig. 1A. A 10 cm long pipe samples the pressure at the edge of the nostril. The nasal airflow induces a micropressure at the pipe inlet which leads to an airflow in the pipe, measured by a thermodilution airflow sensor (bidirectional micro bridge mass airflow sensor, AWM 2000 family, Micro Switch Honeywell). This sensor is based on a constant temperature operating Wheatstone bridge, allowing fast response time (<1 ms) and thus no significant phase shift in our experimental conditions (Fig. 1B). The

bidirectionality of this sensor is essential for recording the different components of the respiratory cycle (inhalation/exhalation, respectively, underpressure/superpressure). The signal is then amplified, filtered (Fig. 1A) and digitalized with a Wavebook 512A device (IOtech) along with the electrophysiological signals (sampling rate 10 kHz). The respiratory signal is used to trigger the olfactometer (Fig. 1A); odor onset is triggered near the maximum of the expiration phase to ensure that the nominal odor concentration is reached before the beginning of the following inspiratory period.

The efficiency of our sensor was tested by using a loudspeaker emulated as a plunger (i.e. used below its resonance frequency). When passed through the loudspeaker (SP-60/8, Monacor International), a triangle electrical input is converted into a square airflow output since the loudspeaker membrane shifting is directly proportional to the applied voltage. Result of testing is shown in Fig. 1B. Since respiratory frequency extends from 1 to 4 Hz in the anesthetized rat, we chose to test our setup at a higher frequency (about 5 Hz) which is the most unfavorable conditions. Even at this higher frequency, the recording setup reacts to airflow direction change with negligible time delay regarding the total duration of the respiratory cycle (Fig. 1B). Other time points, such as peaks of inspiration or expiration, can be slightly time-shifted (a few milliseconds) by analog low pass filtering. Nevertheless, this time shift is limited regarding the total duration of the respiratory cycle. If higher precision is needed, this time shift can be avoided by recording high pass filtered signal and using offline digital filtering (Fig. 1B).

2.2. Respiratory phase computation

Using this monitoring setup, natural breathing signal appears as a periodic phenomenon showing alternating negative deflection (inspiration) and positive deflection (expiration) (Fig. 2A). The expiratory phase can be divided into a dynamic phase and a plateau extending this dynamic period (Fig. 2A).

Previous data revealed the physiological importance of the transition point between inhalation and exhalation (I/E transition) (Buonviso et al., 1992, 2003; Chaput et al., 1992; Litaudon et al., 2003; Wilson, 1998). Methods usually used to extract a phase from this signal (Hilbert transform) did not detect accurately this point because of the asymmetrical nature of the respiratory signal. With the respiratory monitoring setup described in this paper, the I/E transition is a clear zero-crossing of the rising phase of the signal (Fig. 2B) which is easily defined. Peaks of inhalation and exhalation phases are easily detected as the signal maxima and minima between two consecutive I/E points. Inhalation onset (E/I point) is the other reference point as it marks the incoming of odor stimulation. This point is the last point of the plateau extending the dynamic phase of the exhalation, and is much more difficult to automatically detect. After smoothing with a FFT-based low pass filter (30 Hz), this detection is automatically performed by detecting the point which fulfills the two following criteria: (1) its amplitude is below a first threshold (usually 10% of the maximum negative deflection) and (2) its first derivative is negative and higher than a second threshold

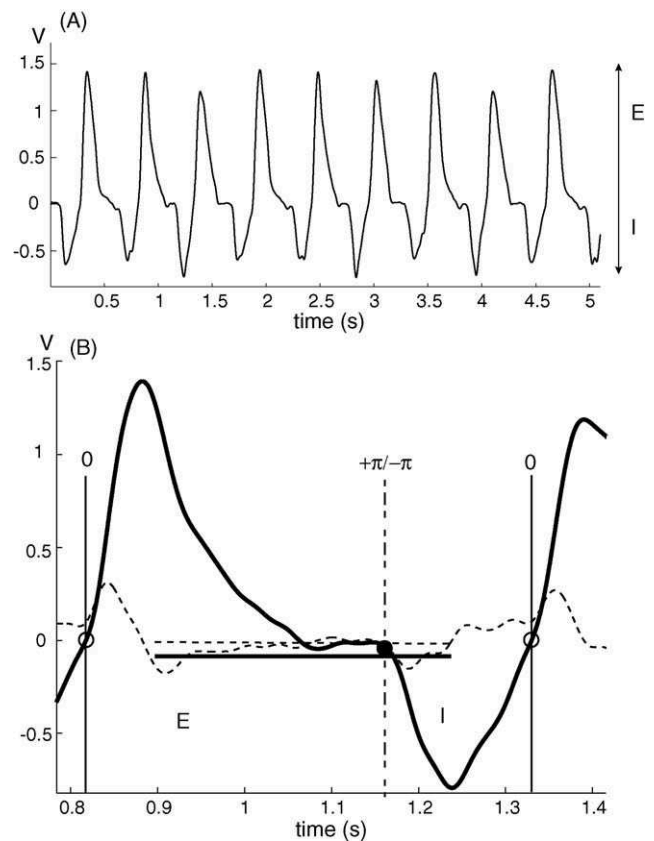


Fig. 2. (A) Respiratory signal. Positive and negative deflections correspond to expiration (E) and inspiration (I), respectively. (B) Respiratory phase detection. Solid thick line: respiratory trace; dotted line: first derivative of respiratory trace. The I/E transition point (open circle) corresponds to the zero-crossing of the respiratory trace rising phase. The E/I transition point (filled circle) is the last point of the plateau extending the dynamic phase of the exhalation which meets two criteria: its amplitude is above an amplitude threshold (horizontal solid line: 10% of the maximum negative deflection of the respiratory trace) and its derivative is negative and lower than a derivative threshold (horizontal dotted line: 10% of the maximum derivative signal).

(10% of the maximum value of the first derivative) (Fig. 2B). From now on, the time component of the respiratory signal is converted into a phase component where 0 represents the I/E transition point and π the E/I point. The phases of the inspiration and expiration are taken linearly between $[-\pi, 0]$ and $[0, \pi]$, respectively (Fig. 2B).

From a total of 1500 recordings, less than 1% failed to be processed with the phase computation method described above. Using a PC-based computer (Pentium 4), analysis of 15 s recording (sampling rate: 10 kHz, respiratory frequency: 2 Hz) takes less than 1 s.

3. Application to olfactory neural events averaging

3.1. Data acquisition

Experimental procedures have been previously explained in details (Buonviso et al., 2003; Litaudon et al., 2003). Briefly, preparation and recordings are carried out in naturally breathing, urethan (1.5 g/kg) anesthetized, Wistar rats. Anesthesia is

maintained by supplemental doses when necessary. All surgical procedures are conducted in strict accordance with the European Communities Council guidelines. Extracellular activity is recorded in the OB and in the piriform cortex using either a glass micropipette or a multichannel silicon probe (NeuroNexus Technology). Odors are presented for 5 s with a flow dilution olfactometer.

Respiratory signal is recorded as explained above. Extracellular activity is recorded as a broadband signal (0.1–5 kHz) and signals are amplified, sampled (10 kHz) and acquired on a computer using the IOTech acquisition system (Wavebook 512A).

3.2. Signal processing

Both respiratory and electrophysiological signals are processed using custom software written in Matlab (The Math Works Inc.) and C language. Unit activity is extracted by band-passing the raw broadband signal from 300 to 3000 Hz and spikes are sorted offline, if necessary, using an algorithm implemented in Matlab (The Math Works Inc.).

Since our aim is to identify and characterize LFP oscillatory activities in time and frequency, we choose a method that preserves both types of information, i.e. a time–frequency representation based on a wavelet transform of the signal (Fig. 3A, left). The LFP signal is first down-sampled (200 Hz) and then convoluted by complex Morlet's wavelets $w(t, f_0)$ (Kronland-Martinet et al., 1987) which have a Gaussian shape both in the time domain and in the frequency domain around its central frequency f_0 :

$$\text{with } w(t, f_0) = A \exp\left(\frac{t^2}{2}\right) \exp(i2\pi f_0 t)$$

The wavelet family we use is defined by $\omega_0 = 2\pi f_0 = 5$, with f_0 ranging from 0 to 100 Hz in 1 Hz step. The time resolution of the wavelet method increases with frequency, whereas the frequency resolution decreases. The time-varying energy $E(t, f_0)$ of the signal in a frequency band around f_0 is defined as the square of the convolution product of the wavelet $w(t, f_0)$ with the signal $s(t)$:

$$E(t, f_0) = [w(t, f_0) * s(t)]^2$$

3.3. Data averaging

3.3.1. Local field potential oscillatory activity averaging

As previously explained, respiratory cycle duration slightly varies either during a trial or between different recording sessions. Therefore, rhythmic induced activity appears with jitter in latency from cycle to cycle making it impossible to directly average time–frequency maps. However, this could be achieved by using a phase representation of the respiratory cycle which provides a normalized time basis for data averaging. The time–frequency map (Fig. 3A, left) is transformed into respiratory phase–frequency maps (Fig. 3A, right) as follows: based on respiratory phase previously extracted, the time–frequency

map computed with Morlet wavelet is first segmented into successive respiratory cycles with alternating inspiration and expiration windows (Fig. 3A, left). Each window is resampled (line by line) with a Fast Fourier Transform method in order to obtain a width identical for each window. This width in pixel depends on the precision required. The phases of the inspiration and expiration windows are taken linearly between $[-\pi, 0]$ and $[0, \pi]$, respectively, as previously explained. Thus, the time–frequency map is rescaled as a respiratory phase–frequency map with alternating inhalation and exhalation phases (Fig. 3A, right). As opposed to time scale, phase scale is reproducible from trial to trial and the phase representation of the respiratory cycle defines the “time basis” which will be used for data averaging. The use of such phase–frequency maps is particularly interesting for averaging LFP oscillatory activities which have been shown to be modulated by breathing (Buonviso et al., 2003). These oscillatory activities are not phase-locked from trial to trial precluding the use of direct raw signal averaging. Fig. 3B (left) shows the scalogram resulting from averaging time–frequency maps (Tallon-Baudry et al., 1998) using the start of the first inhalation period following odor onset as the time-zero reference point. As can be seen, the spots of high activity in the gamma range become progressively blurred and disappear across successive respiratory cycles due to fluctuations in respiratory cycle duration. Conversely, those spots remain distinct across cycles when phase–frequency maps are used (Fig. 3B, right). From phase–frequency maps, we can also compute the mean representation of activity related to respiratory cycle (Fig. 3C, left). Such representation allows accurate calculation of the average phase of oscillatory activity in the different frequency bands which can be used for following statistical analysis. In Fig. 3C, we compare our respiratory cycle segmentation based on two reference point (I/E and E/I, left) with previous methods using only one reference point (I/E transition, right). If the zero phase is accurately defined as the I/E transition point using both methods, the $-\pi/\pi$ phase differs according to the method used. With the method described in this paper, $-\pi/\pi$ is clearly defined as the E/I transition. With the previous method, $-\pi/\pi$ corresponds to the intermediate value between two consecutive I/E points, and cannot be directly related to a respiratory epoch. Consequently, the phase of gamma activity, which is phase-locked with I/E transition, is accurately defined with both methods (Fig. 3C). By contrast, the phase of beta activity which is phase-locked with other respiratory epochs, is more loosely defined when using one reference point segmentation.

3.3.2. Unitary activity averaging

The main application of the respiratory signal processing presented in this paper is to compute oscillatory neural events averaging. But it can also be used to compute a respiratory cycle-triggered raster plot which is a commonly used representation of both bulbar and cortical cell response patterns (Buonviso et al., 1992, 2003; Chaput et al., 1992; Litaudon et al., 2003; Wilson, 1998). First, each spike is time-stamped from the raw signal. Based on the previously extracted respiratory phase, this time position is converted into a phase position relative to the res-

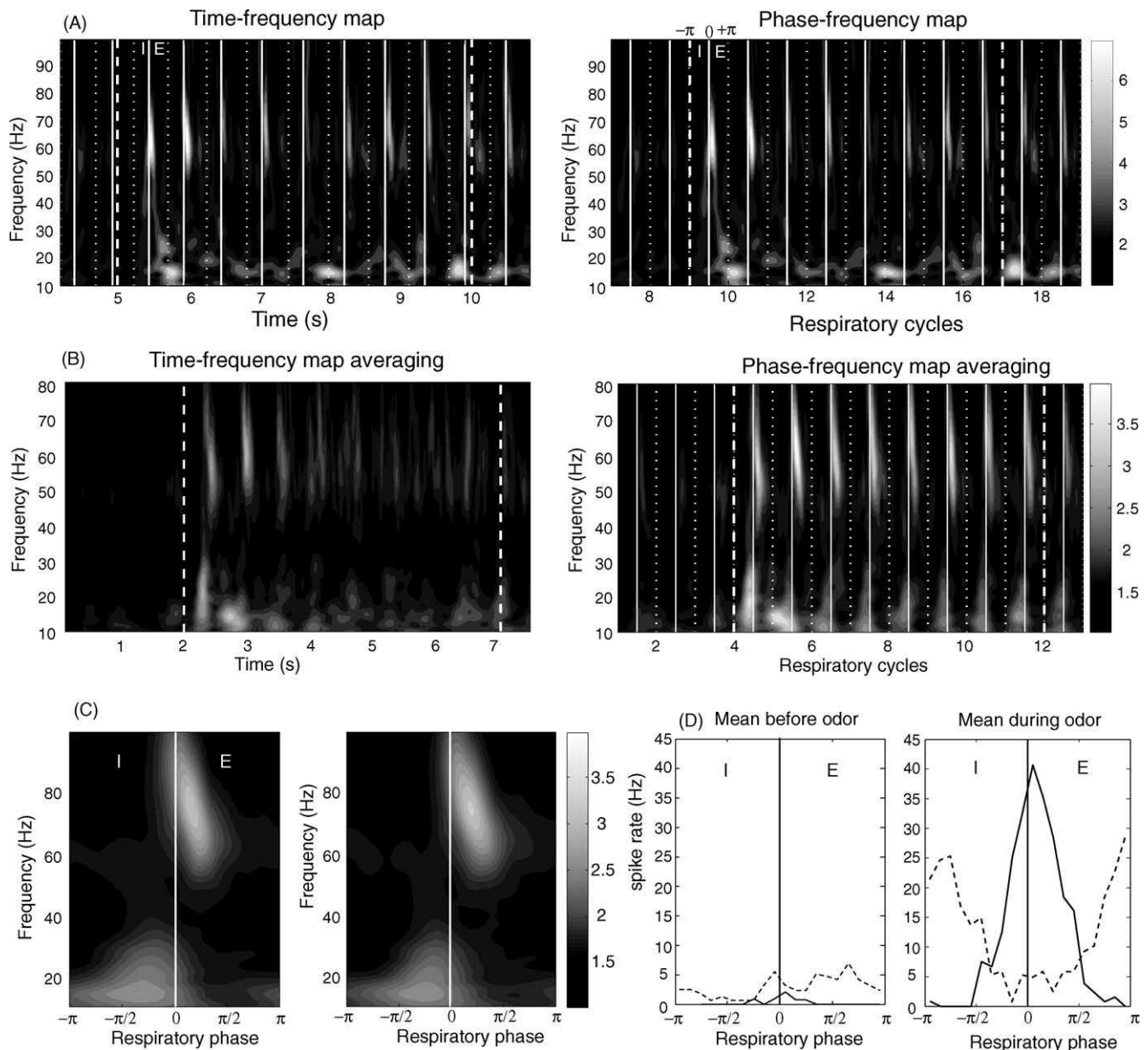


Fig. 3. Oscillatory signal processing and data averaging. (A) time–frequency map (left) and phase–frequency map (right) of the LFP signal recorded in the main OB in response to amyl acetate stimulation (5 s, concentration: $1.8 \cdot 10^{-1}$ of the saturated vapor pressure). White solid line and dotted line indicated I/E and E/I transition point, respectively. Dashed line indicates beginning and end of odor stimulation. Gray scale: energy representation is normalized relative to prestimulus total energy. (B) Mean oscillatory activity evoked by amyl acetate ($n=19$ animals, 1 odor presentation per animal) computed from time–frequency maps (left) or phase–frequency maps (right). (C) Averaged respiratory cycle frequency maps during odor stimulation computed from data used in (B). Computation with respiratory cycle segmentation using both I/E and E/I reference points (left) and I/E reference point only (right). Notice the gamma activity (40–80 Hz) located around the I/E transition point and the beta activity (15–30 Hz) limited to inspiration. (D) Example of two types of averaged synchronized cell responses recorded in the anterior piriform cortex (coordinates relative to bregma: AP = 2.5 mm; ML = 3.5 mm) before (left) and during (right) odor presentation. Averaged I/E synchronized response ($n=6$ cells, solid line) and averaged E/I synchronized response ($n=8$ cells, dotted line). Instantaneous frequency is computed along each respiratory cycle (short sliding window, 50 ms) and average spike rate is calculated relative to the respiratory cycle phase.

piratory cycle which is used to compute histograms of phase distribution along the respiratory cycle. As previously reported (Buonviso et al., 1992, 2003; Chaput et al., 1992; Litaudon et al., 2003), this phase representation can be used to classify response patterns as a function of the respiratory activity. Moreover, it allows to compute the average activity of a given cell response category collected from different trials (Fig. 3D).

4. Conclusion

The present paper describes a rapid and accurate automatic method to analyze respiratory phases. Such method allows to process a large amount of data as compared to manual analysis that are not only time-consuming but can also result in some bias due to human subjectivity. Such an automatic method would not

be possible without a well-suited respiratory recording setup which preserves the temporal course of the respiratory cycle. In this paper, we describe a low cost respiratory monitoring setup which presents several advantages. The detector is located close to the olfactory input compared to piezoelectric devices which gives an indirect image of the nasal airflow through chest-wall movements. Detector positioning is easy and non-invasive compared to thermocouple (Macrides et al., 1982; Uchida and Mainen, 2003). Lastly, this setup is very sensitive and can be used with smaller animal, such as rat pups or mice. This setup is developed to record respiratory activity in anesthetized animals and cannot be used in freely moving rats as implanted thermocouple (Macrides et al., 1982; Uchida and Mainen, 2003).

In previous papers (Buonviso et al., 2003; Litaudon et al., 2003), respiratory phase was taken linearly between two consecutive I/E transition points. Although if the phase of I/E phase-locked activities remained accurately defined (Fig. 3C, right), activities which are phase-locked with other respiratory epochs were more loosely defined since the actual start of the inspiration phase could not be evaluated. The accurate estimation of the E/I transition point is of great importance as it defines the input of sensory information and can be used as the reference point for data averaging. If the analysis presented in the present paper focused on phase relationship between respiratory activity and olfactory neural events, reference points can also be used to evaluate their temporal relationships (Macrides et al., 1982). With the method described in this paper, the precision of analysis can be set by the experimenter. In the example shown in this paper, we used two reference points (I/E and E/I transition points) but maxima of inspiration and expiration could also be considered. A very precise determination of different reference points in the respiratory cycle allows accurate analysis of the temporal distribution of olfactory neural events. Such analysis is of great importance regarding the high speed of odor discrimination that can be achieved in only one sniff (Abraham et al., 2004; Uchida and Mainen, 2003).

The use of the respiratory cycle as a “time basis” provides tools to analyze the role of oscillatory activity in olfactory information processing and permits to collect results in a standardized data format that allows comparisons and averaging across different animals.

References

- Abraham NM, Spors H, Carleton A, Margrie TW, Kuner T, Schaefer AT. Maintaining accuracy at the expense of speed: stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron* 2004;44:865–76.
- Adrian ED. The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1950;2:377–88.
- Boudreau JC, Freeman WJ. Spectral analysis of electrical activity in the prepyriform cortex of the cat. *Exp Neurol* 1963;8:423–39.
- Buonviso N, Chaput MA, Berthommier F. Temporal pattern analyses in pairs of neighboring mitral cells. *J Neurophysiol* 1992;68:417–24.
- Buonviso N, Amat C, Litaudon P, Roux S, Royet JP, Farget V, et al. Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *Eur J Neurosci* 2003;17:1811–9.
- Chaput MA, Holley A. Single unit responses of olfactory bulb neurones to odour presentation in awake rabbits. *J Physiol (Paris)* 1980;76:551–8.
- Chaput MA. Respiratory-phase-related coding of olfactory information in the olfactory bulb of awake freely-breathing rabbits. *Physiol Behav* 1986;36:319–24.
- Chaput MA, Buonviso N, Berthommier F. Temporal patterns in spontaneous and odour-evoked mitral cell discharges recorded in anaesthetized freely breathing animals. *Eur J Neurosci* 1992;4:813–22.
- Fontanini A, Spano P, Bower JM. Ketamine-xylazine-induced slow (<1.5Hz) oscillations in the rat piriform (olfactory) cortex are functionally correlated with respiration. *J Neurosci* 2003;23:7993–8001.
- Freeman WJ. Mass action in the nervous system. New York: Academic Press; 1975.
- Freeman WJ, Schneider W. Changes in spatial patterns of rabbit olfactory EEG with conditioning to odors. *Psychophysiology* 1982;19:44–56.
- Freeman WJ. The physiological basis of mental images. *Biol Psychiatry* 1983;18:1107–24.
- Johnson BN, Mainland JD, Sobel N. Rapid olfactory processing implicates subcortical control of an olfactomotor system. *J Neurophysiol* 2003;90:1084–94.
- Kronland-Martinet R, Morlet J, Grossmann A. Analysis of sound patterns through wavelet transforms. *Int J Patt Recognit Artif Intell* 1987;1:273–302.
- Litaudon P, Amat C, Bertrand B, Vigouroux M, Buonviso N. Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. *Eur J Neurosci* 2003;17:2457–61.
- Macrides F, Chorover SL. Olfactory bulb units: activity correlated with inhalation cycles and odor quality. *Science* 1972;175:84–7.
- Macrides F, Eichenbaum HB, Forbes WB. Temporal relationship between sniffing and the limbic rhythm during odor discrimination reversal learning. *J Neurosci* 1982;2:1705–17.
- Mair RG. Response properties of rat olfactory bulb neurones. *J Physiol* 1982;326:341–59.
- Margrie TW, Schaefer AT. Theta oscillation coupled spike latencies yield computational vigour in a mammalian sensory system. *J Physiol* 2003;546:363–74.
- Onoda N, Mori K. Depth distribution of temporal firing patterns in olfactory bulb related to air-intake cycles. *J Neurophysiol* 1980;44:29–39.
- Pager J. Respiration and olfactory bulb unit activity in the unrestrained rat: statements and reappraisals. *Behav Brain Res* 1985;16:81–94.
- Spors H, Grinvald A. Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 2002;34:301–15.
- Tallon-Baudry C, Bertrand O, Peronnet F, Pernier J. Induced γ -band activity during the delay of a visual short-term memory task in humans. *J Neurosci* 1998;18:4244–54.
- Uchida N, Mainen ZF. Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nat Neurosci* 2003;6:1224–9.
- Walsh RR. Single cell spike activity in the olfactory bulb. *Am J Physiol* 1956;186:255–7.
- Wilson DA. Habituation of odor responses in the rat anterior piriform cortex. *J Neurophysiol* 1998;79:1425–40.

A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal

Stéphane G. Roux^a, Tristan Cenier^{b,c}, Samuel Garcia^{b,c}, Philippe Litaudon^{b,c},
Nathalie Buonviso^{b,c,*}

^a *Laboratoire de Physique, Ecole Normale Supérieure de Lyon, UMR 5672, 46 allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France*

^b *Neurosciences & Systèmes Sensoriels, Université Lyon 1 – CNRS, UMR 5020, 50 avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 07, France*

^c *IFR 19, Institut Fédératif des Neurosciences de Lyon, France*

Received 19 July 2005; received in revised form 1 September 2006; accepted 4 September 2006

Abstract

One of the challenges in analyzing neuronal activity is to correlate discrete signal, such as action potentials with a signal having a continuous waveform such as oscillating local field potentials (LFPs). Studies in several systems have shown that some aspects of information coding involve characteristics that intertwine both signals. An action potential is a fast transitory phenomenon that occurs at high frequencies whereas a LFP is a low frequency phenomenon. The study of correlations between these signals requires a good estimation of both instantaneous phase and instantaneous frequency. To extract the instantaneous phase, common techniques rely on the Hilbert transform performed on a filtered signal, which discards temporal information. Therefore, time–frequency methods are best fitted for non-stationary signals, since they preserve both time and frequency information. We propose a new algorithmic procedure that uses wavelet transform and ridge extraction for signals that contain one or more oscillatory frequencies and whose oscillatory frequencies may shift as a function of time. This procedure provides estimates of phase, frequency and temporal features. It can be automated, produces manageable amounts of data and allows human supervision. Because of such advantages, this method is particularly suitable for analyzing synchronization between LFPs and unitary events.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Rat; Olfaction; Wavelet transform; Ridge extraction; Oscillation phase

1. Introduction

For about 10 years, the study of local field potentials (LFPs) has received an increasing interest, particularly because such signals appear to be relevant indicators of information processing. LFPs, which are considered as the summation of excitatory and inhibitory dendritic potentials (Mitzdorf, 1987), are often oscillatory. Oscillatory synchrony of LFPs between different cortical areas probably has a true functional role. Indeed, it has been shown in human intra-cranial recordings that the

holding of visual information in short-term memory is accompanied by oscillatory synchrony in the β band (15–20 Hz) across distinct visual areas (Tallon-Baudry et al., 2001). In a similar experiment in monkeys, two sites located over the posterior infero-temporal cortex are synchronized in the β band during a memory maintenance task in correct trials, while the synchrony fails to develop in incorrect trials (Tallon-Baudry et al., 2004). On the other hand, as LFP oscillations are supposed to originate in the rhythmic synchronization of groups of neurons (Mitzdorf, 1987), several teams have studied the temporal relationship existing between oscillations and neuronal spike discharges. It has thus, been reported that both activities can become phase-locked under certain behavioral or perceptual conditions (Murthy and Fetz, 1996; Fries et al., 2001; Siegel and König, 2003). Hence, when studying the coherence between LFP oscillations from different brain regions, or the synchronization between spikes and LFP oscillations, the quantification of oscillation phase becomes crucial and the results will depend on its accuracy.

Abbreviations: LFP, local field potential; CWT, continuous wavelet transform; WFT, windowed Fourier transform; LTRS, low time-resolution scalogram; HTRS, high time-resolution scalogram; SPIPH, spike preferential instantaneous phase histogram; SNR, signal to noise ratio

* Corresponding author at: Neurosciences & Systèmes Sensoriels, Université Lyon 1 – CNRS, UMR 5020, 50 avenue Tony Garnier, 69366 Lyon Cedex 07, France. Tel.: +33 4 37 28 74 61; fax: +33 4 37 28 76 01.

E-mail address: buonviso@olfac.univ-lyon1.fr (N. Buonviso).

The traditional Hilbert transform method for phase extraction can only be applied after the signal has been Fourier-filtered around the frequency band of interest if the signal contains oscillations at different frequencies. Although this method is very efficient, it has a major drawback as it suppresses all temporal information. Indeed, the Fourier representation describes the signal as a sum of infinite oscillations and mixes time and frequency information. For non-stationary signal studies, many time–frequency methods exist that analyze the local frequency composition of the signal while preserving temporal information (see Boashash, 1992a,b for review). Among these methods, parametric methods require the operator to have an insight into the data: specifically, the operator needs to determine the frequency range of the oscillatory phenomenon and/or the time boundaries of the oscillatory epochs. Conversely, non-parametric methods such as time–frequency representations (Flandrin, 1993) offer a convenient setup, in which the problem of local amplitude estimation is well understood and addressed, but only in the case of single component signals (Boashash, 1992a,b; Delprat et al., 1992). Further refinements of this setup, described by Carmona et al. (1997), can be used to address multi-component or noisy signal (Carmona et al., 1999). However, an important issue is the computational cost of such methods. The time–frequency map computation multiplies the original amount of data several folds, which could rapidly saturate the computational capabilities of any computer, rendering any further processing or human visual check virtually impossible. This is particularly true in a situation where a high sampling rate leads to a huge number of samples and where, for each sample, precise phase and frequency information is to be extracted.

Here, we propose a new algorithmic procedure, based on wavelet ridge extraction (Delprat et al., 1992), to extract instantaneous frequency and instantaneous phase information from signals sampled at high rate. This method is very robust even when multiple oscillatory regimes are simultaneously present. Moreover, it produces a computationally manageable amount of data. Consequently, it is well suited for the study of synchronization between spike activity and LFP oscillations in the olfactory system of the freely breathing rat, where LFPs oscillate in at least two frequency bands, β and γ , both regimes alternating within each respiratory cycle (Buonviso et al., 2003).

2. Methods

2.1. Continuous wavelet transform and wavelet ridge

2.1.1. Continuous wavelet transform

In order to preserve time and frequency information, one commonly uses time–frequency representation based on a windowed Fourier transform (WFT) or a continuous wavelet transform (CWT). We chose to use CWT instead of WFT because the window size depends on the screened frequency, in case of CWT, as opposed to WFT fixed window size. This represents an asset of the method since the duration of oscillations often shortens as the frequency increases. CWT provides a better compromise between time and frequency resolution. The CWT yields a series of coefficients in time representing the evolution

of the frequency content (Mallat, 1998) of the signal x by:

$$T_{\Psi}[x](t, a) = \int x(s)\Psi_{t,a}^*(s) ds \quad a > 0, t \in R$$

where t stands for time, a for the scale and $*$ for the complex conjugate. The functions $\Psi_{t,a}$ are obtained by dilation and translation of a unique waveform Ψ : $\Psi(t, a) = (1/\sqrt{a})\Psi((s-t)/a)$. The function Ψ , called mother wavelet, is a function with mean value equal to zero, and is characterized by its center frequency (f_0), its spread in time $\sigma_t = \int |\Psi(s)|^2 ds$ and its spread in frequency $\sigma_f = \int |\hat{\Psi}(\omega)|^2 d\omega$ (where $\hat{\Psi}$ indicates the Fourier transform). By decreasing or increasing a , the basis function $\Psi_{t,a}$ is fitted to a segment of $x(t)$; hence, a indirectly represents the frequency of the signal. Squaring the results and dividing by the scale $P_x(t, a) = |T_x(t, a)|^2/a$ generates a time–scale energy density distribution called normalized scalogram. $P_x(t, a)$ represents the energy of the signal in a time–frequency box whose center and size are defined by $(t, (f_0/a))$ and $(a\sigma_t, (\sigma_f/a))$, respectively: when $f=(f_0/a)$ increases (a decreases), the time resolution improves and the frequency resolution worsens. Different families of mother wavelets can be applied. The choice is influenced by the nature of the information to be extracted. For the determination of instantaneous frequency, the most commonly used wavelet is the so-called Morlet wavelet (Kronland-Martinet et al., 1987), defined in the time domain by $\Psi(t) = (1/2\pi)e^{-i2\pi f_0 t}e^{-t^2/2}$ and in the frequency domain by $\hat{\Psi}(f) = (1/2\pi)e^{-2\pi^2(f-f_0)^2}$. A wavelet family is characterized by the constant $\omega_0 = 2\pi f_0$. For large ω_0 , frequency resolution improves at the expense of time resolution. To obtain a wavelet with mean value equal to zero, we need to set $\omega_0 > 5$ (Grossman et al., 1989).

2.1.2. Wavelet ridge extraction

The method determining instantaneous frequency from wavelet ridges was first proposed by Delprat et al. (1992) where the phase coherence of the wavelet transform was used to obtain a numerical estimate of the ridge. For noisy, and/or multi-component signals, Carmona et al. (1997, 1999) proposed to use the localization of the scalogram maxima instead. Note that the detection algorithm is only a particular post-processing method of a time–frequency transform. It can thus, be used with other time–frequency energy representations such as WFT or more generally the family of smoothed Wigner distributions (Auger and Flandrin, 1995; Carmona et al., 1999).

Considering a sinusoidal signal given by the complex exponential function: $x(t) = e^{-i2\pi f_{\Gamma} t}$ where f_{Γ} denotes the frequency, the wavelet transform of the signal is: $T_{\Psi}[x](t, a) = \sqrt{a}\hat{\Psi}(af_{\Gamma})e^{-i2\pi f_{\Gamma} t}$

Substituting the Fourier transform of the Morlet wavelet into this equation, we obtain for the normalized scalogram $P_x(a, b) = (1/4\pi^2)e^{-2\pi^2(af_{\Gamma}-f_0)^2}$. Deriving this scalogram with respect to a , we obtain $(\delta P_x/\delta a)(a, b) = f_{\Gamma}(af_{\Gamma} - f_0)e^{-2\pi^2(af_{\Gamma}-f_0)^2}$. In such conditions, the point (t, a_R) where $\delta P_x/\delta a = 0$ verifies $a_R f_{\Gamma} - f_0 = 0$ and corresponds to the maximum energy of the scalogram. The scalogram is then essentially maximum in the neighborhood of a curve $a_R(t)$, which is the

ridge of the wavelet transform, related to the instantaneous frequency of the signal by the simple expression $f_0/a_R = f_T$. If the scalogram is defined in terms of frequency instead of scale, i.e. $P_x(f, b)$ where $f = f_0/a$, the instantaneous frequency can be read directly from the spectral location of the ridge.

In this paper, we use the localization of scalogram maxima to collect both instantaneous frequency and instantaneous phase information. Indeed, using a complex wavelet allows for the definition of the instantaneous phase of the oscillation mode simply by the angle of wavelet transform, $\arg(T_x(a_R, b))$ along the corresponding ridges. This method has proven efficient even on noisy signals, but it is not suitable for long sets of data since it can prove too time consuming, and produces exceedingly large data files. Here, we propose a new implementation based on two layers of processing, optimized for data with high sampling frequency.

2.2. Implementation for high-sampled signals

Our goal was to create tools that would allow for the comparison of temporal aspects of two components in a signal, where the components are different in nature and characteristics. One component is a fast transitory signal (i.e., neuronal spikes), occurring at high frequencies thus, demanding a high sampling frequency (f_s). The other component (i.e., LFPs) is slow and intermittent and exists in mid-range frequencies (we set the range as $[f_{\min}, f_{\max}]$) therefore, a low sampling rate ($2f_{\max}$) is enough for this component. From the low frequency events, we wanted to extract precise temporal position, instantaneous frequency and instantaneous phase. Furthermore, we wanted our method to be as automated as possible. Since, we needed to correlate this instantaneous phase with the high frequency events, we designed a bilayered processing. First, we computed a low time-resolution scalogram (LTRS) from the filtered and under-sampled raw signal (from f_s to $2f_{\max}$) to obtain a coarse estimation of the oscillation's position. Second, we computed scalograms from the raw signal, around the coordinates of the LTRS maxima. These high time-resolution scalograms (HTRS) can be used to extract accurate phase and frequency information from each recorded sample. This method preserves high-resolution information wherever needed, which is crucial here, and reduces the overall amount of data thus making human supervision easier.

2.2.1. Low time-resolution wavelet transform for mode localization (Fig. 1A)

When looking for oscillations in a $0-f_{\max}$ range, we filtered the signal between 0 and $2f_{\max}$, and then sampled it at $2f_{\max}$. Then the wavelet transform was performed on this smoothed under-sampled signal to obtain a LTRS from which the coordinates in time and frequency of all local maxima above a given threshold were extracted (Fig. 1A, circle). The positions of the maxima were a coarse estimate of the position of the amplitude maxima of oscillatory episodes present in the signal. One asset of this method is that, when under-sampled, the signal is dramatically smoothed thus, enhancing the signal-to-noise ratio. This when combined with the use of a threshold, safely removes the maverick maxima.

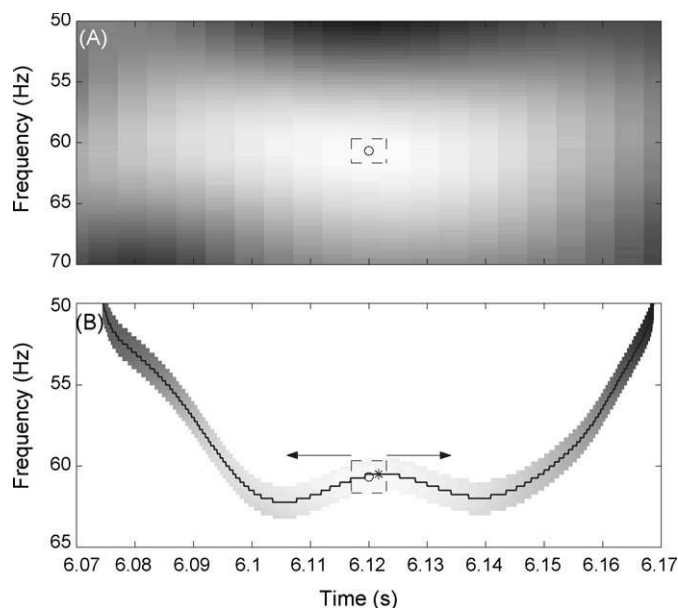


Fig. 1. (A) Low temporal resolution scalogram ($f_{\max} = 100$ Hz). The maximum intensity is represented by the circle. In the neighborhood of this maximum (dashed square), we compute the high temporal resolution ($f_s = 10$ kHz) scalogram, (B) to obtain a more precise location of the maximum (*). From this precise location, the wavelet ridge is recursively extracted in the left and right direction by computing only the neighboring frequency at the next sample time represented by the grey coded pixels.

2.2.2. Ridge extraction from high-resolution scalogram (Fig. 1B)

From the coarse estimation of the position of the maxima obtained from the LTRS, ($t \pm (1/2f_{\max})$), we computed the HTRS from the raw signal in the neighborhood of this position (i.e., for each time sample around the coarse maximum) in order to find the exact location of the maxima ($t \pm (1/f_s)$). From this precise location, the wavelet ridge was computed recursively: from each ridge point, the next one was defined as the maximum of the wavelet transform computed at the next sample time in neighboring frequencies. The ridge stopped when a maximum with energy below a threshold was detected. The ridge computation was performed both forwards and backwards from each maximum. For each maximum detected on the LTRS we obtained a wavelet ridge and its starting and ending times. Then, for each point of that ridge we obtained the local oscillating regime characteristics: instantaneous frequency and instantaneous phase. All computed ridges were then pasted on the LTRS in order to visually check the data computed both on high and low time-resolution.

All programs and routines were written and implemented in C language and Matlab (Math works).

2.3. Example of application on a biological signal: odor-evoked activity in the mammalian olfactory system

Experiments and procedures have been previously explained in detail (Buonviso et al., 2003; Litaudon et al., 2003). Briefly, preparation and recordings were carried out in naturally breathing, anesthetized Wistar rats. Anesthesia (urethane 1.5 g/kg) was

maintained by supplemental doses when necessary. All surgical procedures were conducted in strict accordance with the European Council Guidelines. Electrophysiological activity was collected from the olfactory bulb and piriform cortex using glass micropipettes. Extracellular activity was recorded as a broadband signal (0.1 Hz–5 kHz), amplified and sampled at 10 kHz (f_s) in order to obtain a temporal resolution well suited for both spikes and LFPs analysis. The signal was then acquired on a personal computer using the IOtech acquisition system (*WaveBook*). A recording session lasted 15 s, distributed as follows: 5 s of spontaneous activity (or pre-stimulus period), 5 s of odor-evoked activity and 5 s of activity after stimulation. The signal being sampled at 10 kHz, each file contained 150,000 samples. The single unit activity was extracted from the broadband signal by band-passing from 300 to 3000 Hz (FFT Blackman filter, Matlab software). The spikes were extracted from the signal and individually time stamped. Instantaneous phase and frequency of oscillatory events were measured with the wavelet ridge extraction method described above. In the olfactory system, oscillatory components range from 10 to 80 Hz (Buonviso et al., 2003) and more specifically in two frequency bands defined as β (10–35 Hz) and γ (35–80 Hz). Therefore, the low-resolution wavelet transform was calculated using $f_{\max} = 100$ Hz and $\omega_0 = 7$. Since, the data of biological significance were the difference in oscillatory activity between spontaneous and odor-evoked activity, a fixed threshold was defined as mean ± 5 standard deviations of the time–frequency energy contained in the pre-stimulus period. Extracted ridges were sorted as belonging to the β or γ band according to the frequency of their maximum. Doing this, we characterized onset and duration of each

oscillatory epoch, in both bands, and instantaneous phase and frequency along the ridge. Then, for each time-stamped spike that occurred during an oscillatory epoch, we spotted the instantaneous phase of the LFPs signal at that time stamp and then built two spike preferential instantaneous phase histograms (SPIPH), one for each band (β or γ).

3. Results

3.1. Testing of the method on a synthetic signal

The reliability of the method for instantaneous frequency extraction is well documented (Delprat et al., 1992; Carmona et al., 1997). In this study, we tested this method for instantaneous phase estimation in a synthetic signal and compared the results with those obtained with the commonly used Hilbert method (Fig. 2). The test signal contains two oscillatory components: $A_i \exp(-(t-t_i)^2/2\sigma_i^2) \sin(2\pi\phi(t))$ with for $i=1$, $A_1 = 1.5$, $\sigma_1 = 1$, $t_1 = 2.5$ for $2 < t < 3$ and for $i=2$, $A_2 = 1$, $\sigma_2 = 1.5$, $t_2 = 2$ for $0.5 < t < 4.5$.

The local frequencies are defined by $f_i(t) = d\phi/dt$ with $f_{\text{theo1}}(t) = f_1 + 40(t - t_1)$ with $f_1 = 30$ and $f_{\text{theo2}}(t) = f_2 - 4\cos(4t)$ with $f_2 = 20$. Both modes presented a frequency shift and are not permanent (Fig. 2A). The signal was sampled at 10 kHz and a Gaussian white noise was added. Scalogram in Fig. 2B shows both the wavelet transform of this signal and the extracted ridges. It is clear that both frequency modes are well distinguished and the positions of the ridges are accurately detected. Thus, their respective phase is very well estimated at any time. Indeed, theoretical and calculated phases are perfectly superimposed for

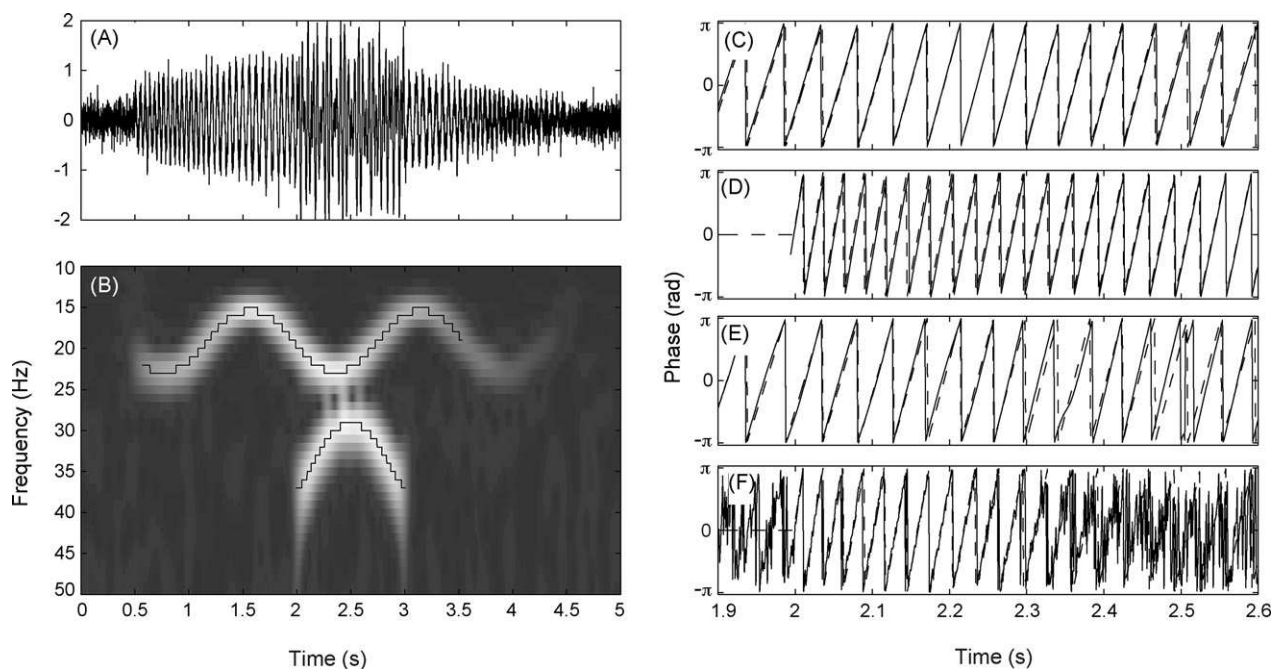


Fig. 2. (A) Signal composed of two sinusoidal modes: a slow one (around 20 Hz), and a faster one (around 35 Hz) each of them non constant in frequency; (B) rescaled scalogram obtained with Morlet wavelet ($\omega_0 = 12$) and coded with 64 gray levels from black ($\min(P(x, a))$) to white ($\max(P(x, a))$). The black lines correspond to the location of the ridges obtained; (C, D) phases extracted (solid line) from low frequency and high frequency signals respectively, using the wavelet ridge method (theoretical phase is indicated by the dashed line); (E, F) same as (C) and (D) but obtained with Hilbert transform of the signal filtered between 10–28 Hz and 28–50 Hz.

both components (Fig. 2C and D). It is noteworthy that both onset and offset of each oscillating event have been automatically detected. In contrast, the extraction of the phase using the angle of Hilbert transform requires that the signal be filtered *a priori* and the filter be carefully chosen. In this example, the signal has been filtered between 10–28 Hz and 28–50 Hz. The graphs in Fig. 2E and F reveal that, for $t > 2.3$, the components were not well separated and gave an unsatisfactory estimation of the phase. Notice that if we had chosen an optimal filter to separate both modes, the phase estimate would have been quite good; nevertheless, it would still have been at the expense of temporal and frequency information. This is illustrated in Fig. 2F where the method finds a phase for $t < 2$ even when the signal is not oscillating. Therefore, in this case, the phase extracted from the Hilbert transform should only be used on portions of the signal (oscillatory periods), after manually setting the limits. In contrast, our method is frequency shift tolerant, and the use of a time–frequency representation enables us to keep both precise temporal and frequency information.

The automation makes possible the analysis of frequency and phase estimation versus signal-to-noise ratio. In order to test to what extent our method is noise-resistant, we performed 100 realizations of the signal for different signal-to-noise ratios. Signal-to-noise ratio is defined as $\text{SNR} = (A_s/A_n)^2$ where A_s and A_n are, respectively the root mean square amplitude of the signal and the noise. For each realization we obtained a set of wavelet ridges. The correct ridges were easily identified as the two longest or most energetic ones. Both ridges gave us an estimation of the frequency $\hat{f}(t)$ and phase $\hat{\phi}(t)$. Then

we computed, for the frequency, the normalized bias and standard deviation: $\langle \hat{f}(t) - f_{\text{theo}} \rangle / f_{\text{theo}}$ and $\langle \hat{f}(t)^2 \rangle - \langle \hat{f}(t) \rangle^2$ for the phase, the bias and standard deviation $\langle \hat{\phi}(t) - \phi_{\text{theo}} \rangle$ and $\langle \hat{\phi}(t)^2 \rangle - \langle \hat{\phi}(t) \rangle^2$. The results are shown in Fig. 3. The normalized bias for the frequency and the bias for the phase are very small and stay constant below 10^{-2} even with very low SNR. Note that this SNR is computed at the frequency sampling. As we apply the filtering/under-sampling process, the SNR increases as the square root of the under-sampling rate. The standard deviation behaves $1/\sqrt{\text{SNR}}$.

3.2. Limitations of the method

There are a few limitations to the extent to which this method can be applied. One is intrinsic to the wavelet ridge extraction method and is encountered when some components of the signal cross each other in frequency domain. Indeed, if two instantaneous frequencies cross each other in the time–frequency plane, their separation is not unique in general cases (Boashash, 1992a). Fig. 4A shows a signal holding two oscillatory components. As evidenced in Fig. 4B, the ridges extracted from this signal merge: it is then impossible to decide which ridge after the crossing point is the continuation of which ridge before that point.

Another limit depends on the choice of the parameter ω_0 of the wavelet. This choice will depend on the frequency composition of the signal. This factor sets the shape of the wavelet. When ω_0 is set too low (Fig. 5B), the scalogram loses frequency resolution, and it is impossible to distinguish between

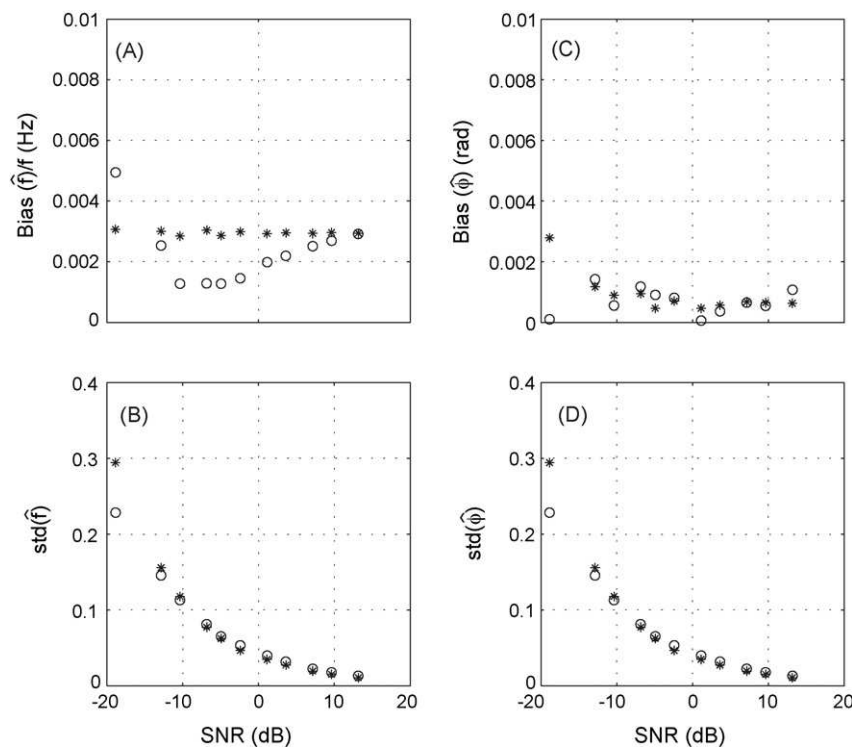


Fig. 3. Bias and variance of the method as a function of SNR: (A) normalized bias of the estimated frequency; (B) standard deviation of the estimated frequency; (C) bias for the estimated phase; (D) standard deviation for the estimated phase. Bias and variance are computed on signals used in Fig. 2 in two different frequency bands: (*) for high frequency, (°) for low frequency.

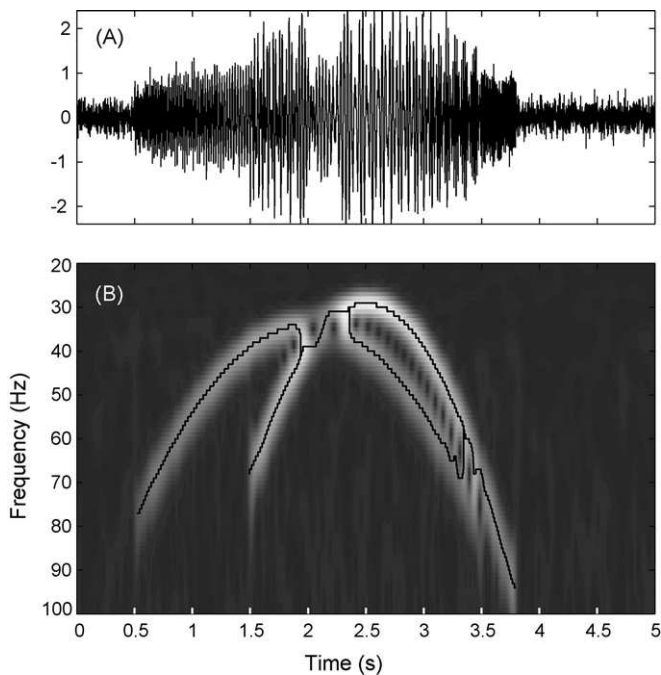


Fig. 4. Limit of the wavelet ridges method: (A) raw signal composed of two sinusoidal modes crossing each other in frequency ($t=2$ s); (B) scalogram with superimposed wavelet ridge (solid line).

the two components of the signal, especially if they exist in close frequency ranges. When ω_0 is set too high (Fig. 5D), the time-resolution of the scalogram is too poor. To address this problem, a simple visual check of the LTRS allows us to judge the validity of the chosen ω_0 value (Fig. 5C). Once the correct value is set, full-scale automation becomes possible.

Finally, although the method is very noise resistant, too much noise could increase the number of detected maxima thus, a ridge might falsely be detected several times. In our case, the filtering and under-sampling smoothed the signal enough to avoid maverick maxima. In other cases, an additional data sorting routine must be implemented to remove redundant ridges. The visual information given by the LTRS and the pasting of the ridges allow us to visually check the validity of the sorting step.

3.3. Example of application on a biological signal: odor-evoked activity in the mammalian olfactory system

As mentioned above, it is an emerging concept in neuroscience that the temporal aspects of brain signals, such as relations between oscillatory LFPs and single neuron activity, could play a major part in the representation of complex information. The custom wavelet ridge extraction method presented here was originally designed to study such temporal aspects, but can be extended to any other subject fields.

As previously described (Buonviso et al., 2003; Neville and Haberly, 2003), odor-evoked activity in the mammalian olfactory system presents oscillatory bursts in both bulbar and cortical LFPs (Figs. 6 and 7). Such activity exhibits two frequency bands (β and γ activities, respectively 15–35 Hz and 35–80 Hz) that alternate along a single respiratory cycle. The spiking activity in these structures is not linear: cells tend to fire preferentially

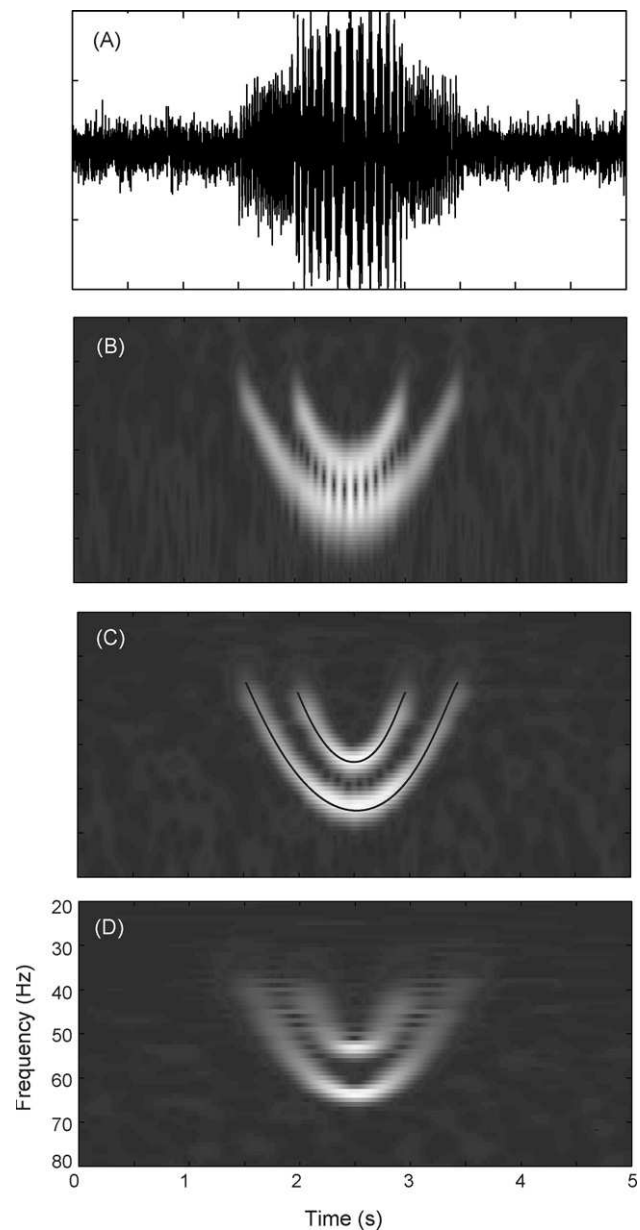


Fig. 5. Preliminary tests setting the right wavelet shape for wavelet ridge extraction: (A) raw signal composed of two closed sinusoidal modes non constant in frequency; (B, C, D) scalograms computed with increasing wavelet coefficient ($\omega_0 = 6, 12, 24$). This parameter should be set carefully to allow accurate extraction of the wavelet ridge (C).

during oscillatory periods. Here, the qualitative and quantitative study of spike phase locking requires phase measurements to be conducted with the same accuracy in every frequency band, while preserving temporal information. The wavelet ridge extraction method meets all these requirements. It was performed as described in the methods section; on average, analysis of a 15 s recording (sampling rate: 10 kHz) took about 21 s. It successfully extracted the temporal information and instantaneous frequency and phase of the oscillatory bursts, even when two oscillatory modes were present, from both bulbar and cortical structures (Figs. 6A–E and 7A and B). The extracted phases are linear for all ridges, as can be seen in Figs. 6E and 7B.

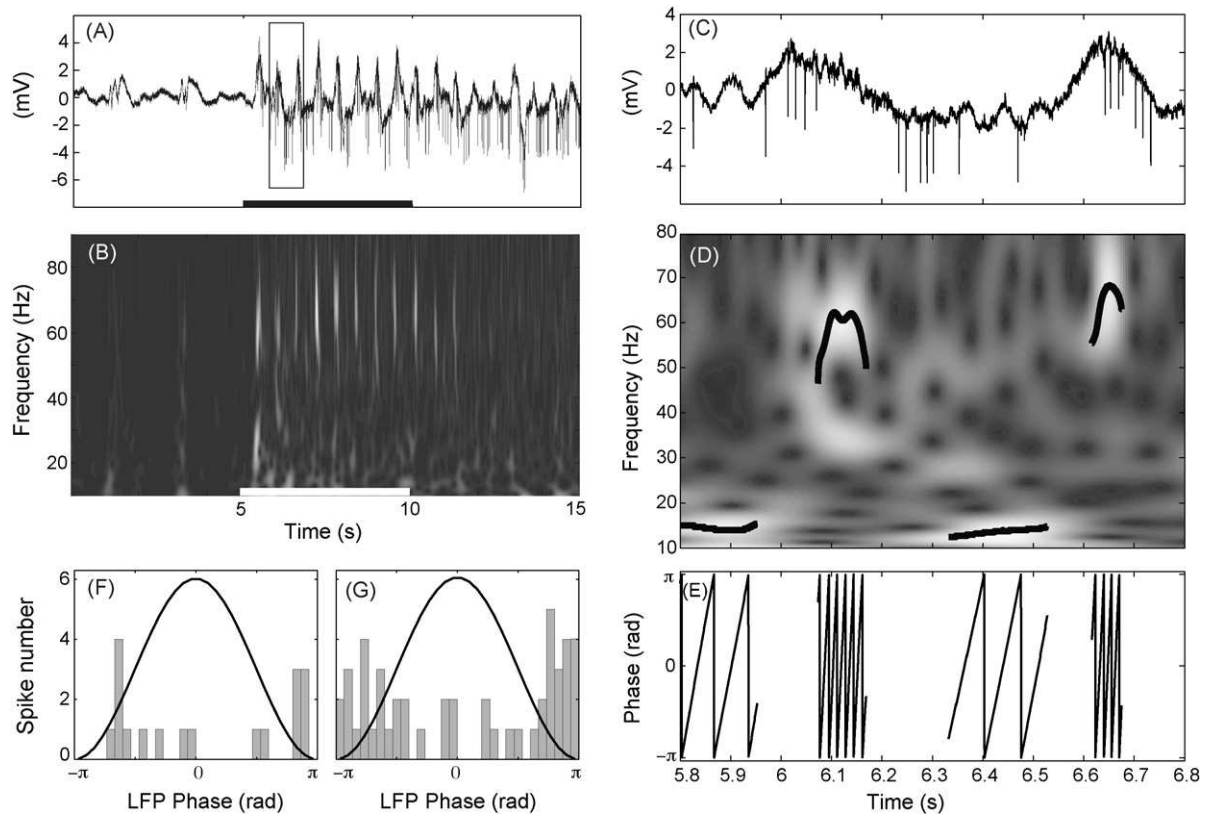


Fig. 6. Analysis of an olfactory bulb activity: (A) single trial, whole raw signal, duration 15 s; (B) corresponding low time-resolution scalogram. The white thick line at bottom indicates the 5 s long odor stimulation. Total number of spikes: $n = 71$; (C) enlargement of inset in (A) showing both LFP oscillations and spiking activity for a 1 s duration; (D) corresponding low time-resolution scalogram. The thick black lines represent the wavelet ridges obtained from the high resolution scalogram; (E) linear phase extracted from each wavelet ridge; (F, G) SPIPHs constructed from β (F) and γ (G) episodes. Solid line: LFPs phase. Histograms were computed from the 5 s odor evoked response (SPIPH for β (F) $n = 18$ spikes; SPIPH for γ (G): $n = 48$ spikes).

Then, knowing (i) the onset and duration of each oscillatory period; (ii) the instantaneous phase and frequency of the signal at every time-stamp (or phases if more than one oscillatory events exist at a given time-stamp); and (iii) the time-stamp of every spike, we were able to construct spike preferential instantaneous phase histograms (SPIPHs) for each frequency band. Examples of typical SPIPH are presented in Figs. 6 and 7. In the olfactory bulb (Fig. 6F and G), the histograms for a particular neuron reveal the tendency of that neuron to spike preferentially during the falling phase of the LFP γ oscillations. In the piriform cortex, the single-trial SPIPH (Fig. 7C) suggests the same tendency: spikes occur at a preferential phase during γ epochs. To verify this tendency we constructed an average SPIPH with data collected from six cells (Fig. 7D). The phase locking between spikes and LFPs thus, appeared very clearly and was quantified (mean phase = -3.00 ± 1.13 rad). Its significance was estimated using the Rayleigh circular directionality test ($p < 0.001$).

4. Discussion

Study of local field potentials could be a valuable tool toward understanding brain functions. Many studies focus on trying to elucidate the role and mechanisms of LFPs. Depending on the experimental conditions, the recorded signals may possess different characteristics: (i) stationary or non-stationary; (ii)

containing one or more oscillatory frequencies; (iii) oscillatory frequencies may shift as a function of time. From such signals, the important information to be accurately extracted is local frequency and phase of each oscillatory epoch as well as its temporal characteristics (onset and duration). In this paper, we described a method using ridge extraction on CWT that answers all these requirements.

The first stage of the method consists of extracting the spectral components of the signal. CWT method has been chosen because of its lesser susceptibility to non-stationary (versus Hilbert method) and because of its better time–frequency resolution (versus FWT method). Indeed, traditional signal processing methods that rely on the Hilbert transform of a filtered signal are well adapted for signals that exhibit permanent oscillation. But in the case, where the oscillations appear intermittently, these methods fail to give information either on time or on frequency characteristics of the oscillations. As shown in Fig. 2, Hilbert transform failed to detect boundaries of oscillatory events and erroneously found a phase where the signal did not appear to oscillate. For such non-stationary signals, non-parametric time–frequency methods (Flandrin, 1993) offer a more convenient setup for conducting research, without requiring any *a priori* knowledge of the recorded data. In this type of representation, a correct estimate of the signal frequency composition depends on the choice of the window size. The CWT has been

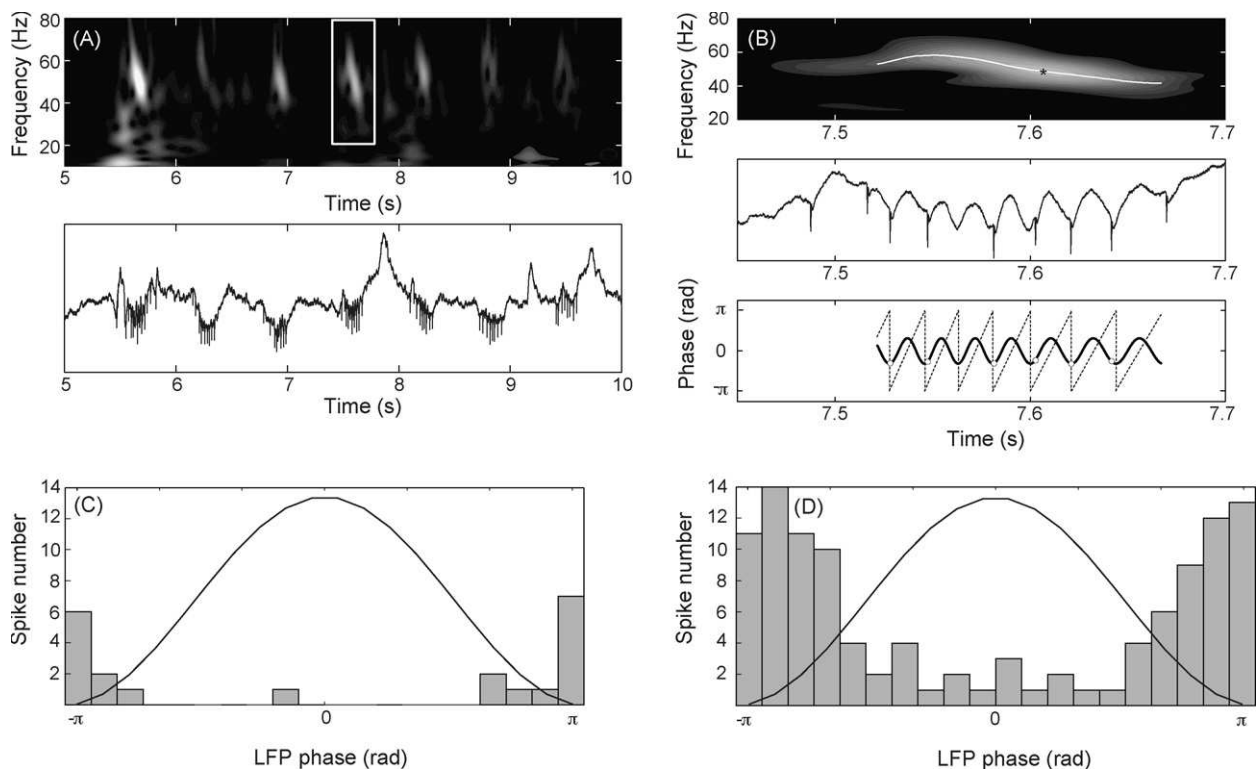


Fig. 7. Analysis of a piriform cortex activity: (A) low resolution scalogram (top) and corresponding raw signal (bottom) showing both LFP oscillations in the γ range and a spiking unitary activity (total number of spikes: $n = 73$); (B) enlargement of the inset in A. From top to bottom: low resolution scalogram displaying local maxima (*) and wavelet ridge (white solid line); raw signal; phase extracted along the ridge with superimposed location of spikes (open circle); (C) SPIPH during odor stimulation (5 s) computed from the single cell shown in A, B ($n = 21$ spikes); (D) SPIPH during odor stimulation (5 s) computed from a repetition of six trials ($n = 314$; mean phase = -3.00 ± 1.13 rad).

preferred to the widely spread WFT due to CWT's ability to detect oscillations with very different frequencies and durations. This ability comes from the fact that in CWT the window size varies with the inverse of the frequency in opposition to the WFT where the window size is constant. As the duration of the window becomes shorter for higher-frequency bands, CWT provides a better compromise between time and frequency resolutions. CWT is characterized by the parameter ω_0 which should be set to optimize temporal and frequency resolution. For frequencies of interest ranging from 15 to 100 Hz, a value around seven was commonly used (Tallon-Baudry et al., 1997; Ravel et al., 2003).

From this time–frequency representation, instantaneous phase and frequency information was obtained using the ridge extraction method, which presents several advantages. First, the two-layer algorithm reduces computation time as it only focuses on self-defined areas of interest. It considerably reduces the amount of stored data without impairing the ability to check the validity of the results. Second, this method is very noise resistant as shown in Fig. 3. Moreover, the use of both a smoothing filter and a threshold for detecting maxima prevents multiple detections of the same ridge. As mentioned above, this method proved unable to follow the frequencies of multiple oscillatory components when these components' frequencies crossed each other (see Fig. 4). Nevertheless, this limitation, which is inherent to time–frequency representation, is not troublesome for analyz-

ing neuronal activity where oscillatory events are generally well separated both in time and frequency. One more asset of the proposed method is that it can be fully automated after a few preliminary tests.

As previously underlined, accurate estimation of instantaneous phase and frequency of oscillatory activity is a prerequisite to the analysis of temporal relationship between neuronal spike discharges and oscillations. In the olfactory system, the temporal relationship between spikes and LFPs have been approached in several studies conducted on insect (Laurent et al., 1996), fish (Friedrich et al., 2004), and rabbit (Kashiwadani et al., 1999). All of them used an *a priori* signal filtering in a precise frequency band, and then extracted peaks, troughs and zero-crossings of the LFPs signal to use as phase reference points. These methods are convenient and valid on data collected in those cases because LFPs oscillate within a single frequency band and the signal is stationary. Such methods cannot be applied to analyze recordings from the freely breathing rat olfactory system however, where signals are largely non-stationary and exhibit frequency shifts. Indeed, odor-evoked LFPs exhibit periods of β and γ oscillatory activity that alternate during a respiratory cycle (Buonviso et al., 2003; Neville and Haberly, 2003), but seldom overlap during very short periods, and the frequency often changes during β episodes. Our wavelet ridge extraction method overcomes the extra-complexity of LFPs from freely breathing rat olfactory system. Furthermore, for β and γ oscil-

lations occurring at the same time, time-stamped spikes would yield two phases, one for each ridge or frequency band. The results obtained regarding phase relationship between spikes and LFPs are very promising.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from CNRS “Programme Interdisciplinaire: Cognition et Traitement de l’Information”.

References

- Auger F, Flandrin P. Improving the readability of time–frequency and time–scale representations by the reassignment method. *IEEE Trans Signal Proc* 1995;43(5):1068–89.
- Boashash B. Estimating and interpreting the instantaneous frequency of a signal. I. Fundamentals. *Proc IEEE* 1992a;80:520–39.
- Boashash B. Estimating and interpreting the instantaneous frequency of a signal. II. Algorithms and applications. *Proc IEEE* 1992b;80:540–68.
- Buonviso N, Amat C, Litaudon P, Roux S, Royet JP, Farget V, Sicard G. Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *Eur J Neurosci* 2003;17:1811–9.
- Carmona R, Hwang W, Torresanni B. Characterization of signals by the ridges of their wavelet transform. *IEEE Trans Signal Proc* 1997;45:2586–90.
- Carmona R, Hwang W, Torresanni B. Multiridge detection and time–frequency reconstruction. *IEEE Trans Signal Proc* 1999;47:480–92.
- Delprat N, Escudie B, Guillemeine P, Kronland-Martinet R, Tchamitchian P, Torresanni B. Asymptotic wavelet and Gabor analysis: extraction of instantaneous frequencies. *IEEE Trans Inform Theory* 1992;38:644–64.
- Flandrin P. Temps–fréquence. *Traité des nouvelles technologies*. Paris: Hermès; 1993, 408.
- Friedrich RW, Habermann CJ, Laurent G. Multiplexing using synchrony in the zebrafish olfactory bulb. *Nat Neurosci* 2004;7:862–71.
- Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R. Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* 2001;291:1560–3.
- Grossman A, Kronland-Martinet R, Morlet J. Reading and understanding continuous wavelet transform. In: Combes JM, Grossman A, Tchamitchian P, editors. *Wavelets, time–frequency methods and phase space*. Berlin: Springer-Verlag; 1989. p. 2–20.
- Kashiwadani H, Sasaki YF, Uchida N, Mori K. Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular ranges in the rabbit olfactory bulb. *J Neurophysiol* 1999;82:1786–92.
- Kronland-Martinet R, Morlet J, Grossmann A. Analysis of sound patterns through wavelet transforms. *Int J Patt Recog Artif Intell* 1987;1:273–302.
- Laurent G, Wehr M, Davidovitz H. Temporal representations of odors in an olfactory network. *J Neurosci* 1996;16:3837–47.
- Litaudon P, Amat C, Bertrand B, Vigouroux M, Buonviso N. Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. *Eur J Neurosci* 2003;17:2457–61.
- Mallat S. *A wavelet tour in signal processing*. New York: Academic Press; 1998.
- Mitzdorf U. Properties of the evoked potential generators: current source-density analysis of visually evoked potentials in the cat cortex. *Int J Neurosci* 1987;33:33–59.
- Murthy VN, Fetz EE. Synchronization of neurons during local field potential oscillations in sensorimotor cortex of awake monkeys. *J Neurophysiol* 1996;76:3968–82.
- Neville KR, Haberly LB. Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 2003;90:3921–30.
- Ravel N, Chabaud P, Martin C, Gaveau V, Hugues E, Tallon-Baudry C, Bertrand O, Gervais R. Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60–90 Hz) and beta (15–40 Hz) bands in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 2003;17:350–8.
- Siegel M, König P. A functional gamma-band defined by stimulus-dependent synchronization in area 18 of awake behaving cats. *J Neurosci* 2003;23:4251–60.
- Tallon-Baudry C, Bertrand O, Delpuech C, Perrier J. Oscillatory gamma-band (30–70 Hz) activity induced by a visual search task in humans. *J Neurosci* 1997;17:722–34.
- Tallon-Baudry C, Bertrand O, Fischer C. Oscillatory synchrony between human extrastriate areas during visual short-term memory maintenance. *J Neurosci* 2001;21:RC1771–5.
- Tallon-Baudry C, Mandon S, Freiwald WA, Kreiter AK. Oscillatory synchrony in the monkey temporal lobe correlates with performance in a visual short-term memory task. *Cereb Cortex* 2004;14:713–20.

B Article de modélisation

ENTRAÎNEMENT SPÉCIFIQUE DES CELLULES MITRALES PENDANT LES OSCILLATIONS GAMMA DANS LE BULBE OLFACTIF DU RAT.

Specific Entrainment of Mitral Cells during Gamma Oscillation in the Rat Olfactory Bulb
François O. David¹, Etienne C. Hugues¹, Tristan Cenier, Nicolas Fourcaud-Trocmé, Nathalie Buonviso.
En cours de soumission dans *PLoS Computational Biology*.

LES OSCILLATIONS DES POTENTIELS DE CHAMP LOCAUX (LFP) sont souvent accompagnés par la synchronisation de l'activité dans une large zone cérébrale. En conséquence, les LFP et la cohérence entre neurones semble être le résultat d'un mécanisme sous-jacent à la formation d'assemblées de neurones. Nous avons choisi le modèle du bulbe olfactif afin d'y rechercher, 1) dans quelle mesure activités unitaires et oscillations des LFP peuvent être corrélés et 2) le degré de précision avec lequel un modèle des mécanismes sous-jacents pourrait expliquer des données expérimentales. Pour ce faire, nous avons analysé des enregistrements simultanés de l'activité unitaire des cellules mitrales (MC) et des LFP chez le rat anesthésié en réponse à une stimulation olfactive. Les trains de potentiels d'action émis à des taux spécifiques établissent une relation cohérente avec la phase des oscillations gamma. L'utilisation d'un modèle de MC, intégrant des conductances excitatrices et inhibitrices alternantes en supplément d'une faible conductance inhibitrice oscillante à la fréquence gamma nous a permis d'expliquer les données expérimentales par un mécanisme de résonance. Ce travail apporte des éléments sur la façon dont un les propriétés intrinsèques des cellules MC et le réseau participent au cadencage des potentiels sur l'oscillation gamma dans un contexte physiologique réaliste et résultatn dans la formation d'assemblées de neurones synchronisés. Enfin, nous discutons comment un processus d'auto-synchronisation incluant avec ces propriétés d'entraînement permet d'expliquer, en conditions expérimentales, 1) pourquoi les bouffées d'oscillations gamma émergent de façon transitoire avec un maximum d'amplitude cohérent avec la variation d'intensité du stimulus, 2) pourquoi les oscillations sont proéminentes spécifiquement à la fréquence gamma et 3) pourquoi l'amplitude des oscillations est dépendante des propriétés du stimulus. Les principes de traitement de l'information et les rôles fonctionnels associés à ces mécanismes sont également discutés.

¹Ces deux auteurs ont contribué à part égale à ce travail.

Abstract

Background: Local field potential (LFP) oscillations are often accompanied by synchrony of the activity within a widespread cerebral area. Thus, the LFP and neuronal coherence appear to be the result of a common mechanism that underlies neuronal assembly formation. We used the olfactory bulb as a model to investigate (1) the extent to which unitary dynamics and LFP oscillations can be correlated and (2) the precision with which a model of the hypothesized underlying mechanisms can accurately explain the experimental data. For this purpose, we analyzed simultaneous recordings of mitral cell (MC) activity and LFPs in anesthetized and freely breathing rats under odorant stimulation. Spike trains were found to be phase-locked to the gamma oscillation at specific firing rates and to form odor-specific temporal patterns. Use of a conductance-based MC model, which was driven by a balanced excitatory-inhibitory conductance and a relatively small inhibitory conductance that oscillated at the gamma frequency, allowed us to explain the experimental data by a mode-locking mechanism. This work shed light on the way the network and intrinsic MC properties participate in the locking of MC to the gamma oscillation in a realistic physiological context and may result in a particular synchronous assembly. Finally, we discuss how a self-synchronization process with such entrainment properties can explain, under experimental conditions, (1) why the gamma bursts emerge transiently with a maximal amplitude position relative to the stimulus time course, (2) why the oscillations are prominent at the specific gamma frequency, and (3) why the oscillation amplitude depends on specific stimulus properties. Information processing and functional consequences that are derived from this mechanism are also discussed.

Introduction

Recent experiments into behavioral conditions indicate that there is little effective spatial contrast in the firing rate of neurons in sensory structures [1,2], which suggests a limited role for the mean firing rate in sensory function. On the other hand, the role of spike timing for plasticity [3] and coding [4] suggests that the temporal structure may be crucial for perception. Indeed, various functional studies have reported that fast oscillations, particularly those in the gamma band (40-80 Hz), are related to perception and attention [5] and may provide a time reference for coding [6]. Still, the neuronal mechanisms that are proposed for gamma oscillations [7-11] are not sufficient to explain the various causes of gamma oscillation, the structure of the spike trains, or the spike phases during these events.

In the mammalian olfactory bulb (OB), odorant stimulation induces local field potential (LFP) oscillations both in the gamma and beta (15-35 Hz) ranges. Data are disparate concerning the conditions of expression for these oscillations. In the anesthetized animal, gamma and beta oscillations are odor induced and appear in alternation along the respiratory cycle, with gamma bursts specifically occurring at the inspiration/expiration (I/E) transition epoch [12,13]. In the awake rat, gamma and beta oscillations spontaneously exist, and odors evoke an increase [14] or a decrease [15] in gamma power. Such discrepancies probably originate in the differential stimulus sampling in the different models due to different sniffing strategies [16]. Nevertheless, oscillations have been described as crucial for coding in insect or fish [17,18] and as reflecting the experience of the animal in rodent [19,20].

An important observation is that gamma oscillations appear coherently through the whole OB and cortex [21,22], which is not true for beta oscillations [21]. This feature is a fundamental parameter when considering gamma oscillations as a time reference for coding. Nevertheless, the relationship between odorant stimuli, LFP activity, and actual physiological mechanisms needs further explanation, in particular, at the level of the spike train structure of mitral cells (MCs) during the gamma oscillations. None of the previous studies was specifically designed to study the phasing of spikes from individual neurons on a gamma oscillation that was modulated by breathing. Indeed, the first such study [23] used multi-unit activities and, thus, was not able to examine specific patterns of spikes in individual cells. Another series of studies were either performed *in vitro* [24] or *in vivo*, but in the insect [25] or fish [18,26], so that the gamma oscillations were again not modulated by respiration. The study by Kashiwadani et al. [27] was performed in the breathing rabbit, but the breathing was reduced to an artificial sniff, which resulted in data processing that had neither qualitatively nor quantitatively the precision that we required.

The aim of the current study was two-fold: (1) analyze the fine temporal relationships that exist between MC spikes and gamma oscillations in the anesthetized, freely-breathing rat under odorant stimulation and (2) test the possibility of MC spike entrainment by gamma oscillation and explore to what extent the experimental results could be explained by a simple MC model submitted to network-like inputs. Our results showed that during transient periods of gamma oscillation, a subset of MC is entrained to these oscillations in specific patterns that were related to the nature of the odorant stimuli. A model of MC entrainment could effectively describe these patterns. We further explored the model dependence on MC input activity and intrinsic properties and showed that gamma range oscillations were optimal for MC entrainment. Overall, these results provide the first quantitative and modeling study that links gamma LFP oscillations that are evoked in freely breathing conditions to spike trains in the OB.

Results

Part I: Experimental data analysis

Gamma LFP oscillations are recurrent and stable, and the firing rate is highly variable

Under our anesthetized conditions, odorant stimulation elicited LFP oscillations in the whole OB and spiking activity in the MC layer. Respiratory modulation appeared as a slow, large-amplitude oscillation (~2 Hz) that was visible on the raw trace (Fig. 1A). Although slower than under waking conditions, this respiratory modulation could be associated with theta range frequencies (4-10 Hz). The time-frequency representation (TFR) (Fig. 1B) led to the observation of two other oscillatory frequencies, which were beta oscillations in the 15-35 Hz range and gamma oscillations in the 40-80 Hz range. Gamma bursts recurred at each respiratory cycle around the inspiration/expiration (I/E) transition [12] (Fig. 1B) and were nearly independent of the odorant stimulus. In contrast, the characteristics of beta bursts depended on the molecular features of the odor [13]. The gamma oscillation positions during the respiratory cycles were remarkably stable between odors, always starting at the I/E transition. The distribution of gamma burst mean frequencies was fitted with a narrow Gaussian distribution with a mean of 60.7 Hz (standard deviation: 8.8 Hz) (Fig. 1C, top). Inside each gamma burst, the cycle to cycle frequency was even more stable. Indeed when each cycle frequency, which was inverse of its length, was normalized relative to the mean frequency of its gamma bursts, the resulting distribution could be fitted with a Gaussian distribution that had a standard deviation that was lower than 0.1, which indicated low variability (Fig. 1C, bottom).

In contrast, the MC instantaneous frequencies were highly variable (i) within the same cell, between different epochs of the respiratory cycle, (ii) within the same cell, between odors, and (iii) between simultaneously recorded units. An example is given in Fig. 1D, which shows the course of instantaneous frequencies during the period of a respiratory cycle for six cells that responded to the same odor. These examples show that the MC activities are highly modulated and variable during the respiratory cycles, as previously described [28-30].

Due to the bulbar-specific origins of gamma oscillations and to the regular occurrence of these oscillations across the bulbar surface, we focused our measurements on neuron discharges during LFP gamma bursts. To simplify the comparison between bursts of different frequencies, the interspike intervals (ISI) will always be expressed in fractions of their gamma burst average period (the Cycle unit), and, similarly, MC spike rates will be expressed in spikes per cycle (SpC). The ISI distribution that was observed during these gamma bursts was plotted in Fig. 1E (grey bars). We compared these distributions with a gamma distribution (black line) that reflected the usual random discharge of a neuron with a similar refractory period (0.18 cycle (=3 ms)) and the same mean ISI (1.18 cycle) as the experimental distribution. We observed two major deviations of the experimental ISI distribution from the gamma distribution. One appears around 0.1-0.2 cycle and corresponds to the numerous spike doublets (or high frequency bursts) that can be observed in MC discharges [29]. The second deviation is an excess of experimental ISI around 0.9-1 cycle. About 25% of the ISIs are between 0.8 and 1.2 cycle, compared to 18% for the gamma distribution. The latter suggests that, during gamma bursts, a large fraction of MCs tended to fire at a rate close to the oscillation frequency.

The contrast between the regularity of oscillation frequency and the variability of spike discharge led us to the idea that coupling between both activities could be dependent on neuronal frequency. This hypothesis was investigated further in the following analyses.

Spike phase distribution during LFP gamma oscillations depends on the MC firing rate

When an LFP gamma oscillation was evoked in OB slices, the distribution of GABA_A (Gamma Amino Butyric Acid) event times according to the oscillation phase was phased [24] (see Fig. 4G in ref. 24). According to these observations, the MCs should receive, on average, an oscillating conductance locked to the LFP gamma oscillation. Therefore, we expected the MC firing activity to correlate with the phase of the LFP gamma oscillation. For the whole

population of MCs, the spike phase distribution was peaked (Fig. 2A), with a maximum around phase 0.5 (circular deviation of $\sigma=1.67$ and a significantly phased distribution, $P \ll 0.001$, Rayleigh non-uniformity test). However, when the cells are segregated according to their average firing rate, we observe that cells with a rate below 1.2 SpC were better phased (Fig. 2B). We thus wondered what the difference was in the relationship between LFP fast oscillations and cells spiking at low or high firing rate.

Looking at individual spike trains on the raw signal (Fig. 2C), we noticed some particular configurations of spikes-LFP phase coupling. Spike trains with ≤ 1 SpC (Fig. 2C, upper panel) were often stable in phase and occurred preferentially during the trough of the oscillation. On the other hand, we observed that some spike trains with >1 SpC exhibited multiple but similar phases across cycles of the oscillation (Fig. 2C, lower panel). This relationship between spike phase-locking and MC firing rate raised the possibility that MC populations might segregate according to their firing rate. We thus decided to examine systematically the relationship between phase trains and LFP oscillations while taking this observation into account.

Specific phase-locking and spike rate control by gamma LFP oscillation

Inspection of spike phases (represented by grey sticks in Fig. 3A and 3B) revealed that a large number of spike trains contained spikes that had phases that were reproducible across cycles. Therefore, we automatically detected and classified the phase-locked patterns according to six q:p types, which were 3:1, 2:1, 1:1, 2:3, 1:2, and 1:3, where q:p indicates p spikes during q cycles (see Methods and Fig. 9 for details of the classification). Some examples of these phase-locked patterns are represented in Fig. 3B, which shows the periodicity of phases over a few cycles. Opposing residual trains (see Fig. 9 for supplementary examples) showed a drift or at least high variability of phases across cycles. Among the 898 spike trains that spread over at least three oscillation cycles, 278 (31%) spike trains had one of the q:p patterns. Patterns 1:1 and 2:1 were the most frequently observed, and they accounted for 67% and 19% of the observations, respectively (Fig. 3C, grey bars).

In order to test the significance of these results, we compared our experimentally recorded patterns to patterns that were expected by chance when the phase-locked pattern detection was applied to a randomly generated spike train family with the same firing rate distribution (see methods for details).

We observed that the proportion of phase-locked spike trains among all spike trains was reduced (15% in the random distribution) compared to the experimental results (30%). As detailed in the methods section, the classification of a spike train as a pattern is a two step process. First, a “relative distance” between each experimental (or random) spike train and theoretical patterns was computed, which indicated how close they were in terms of spike count. The “relative distance” distribution (Fig. 3D) was similar between the experimental and randomly generated spike trains, which attested to the closeness of the random and experimental spike train distributions in terms of spike count. Thus, the differences between experimental and random data must be due to the second step of the classification process, which estimates a “jitter” that measures the reproducibility of spike phases across cycles. Indeed when comparing the distribution of jitter for experimental and random spike trains, the jitter values that fell below the jitter threshold (i.e., 0.5 dashed lines in Fig. 3E) were more numerous for the experimental spike trains than expected by chance. Additionally, experimental and random phase distributions showed significant differences for the 3:1, 2:1, 1:1, and 1:2 patterns (Kolmogorov-Smirnov test, $p < 0.05$) (Fig. 3E). Significance was not reached for the 2:3 and 1:3 patterns due to the small number of experimental observations of these patterns ($N=21$ and $N=8$). In addition, the relative proportions of the different type of phase-locked patterns were similar (45% and 36% for the 1:1 and 2:1 patterns) in the experimental and random conditions. It was noticeable, however, that the proportion of the 1:1 pattern in comparison to other patterns was significantly higher in the experimental conditions than in the random conditions (Chi-square test, 70, $p < 0.01$). Overall, these results showed that a significant population of MCs can be locked to the oscillation for various

individual MC firing rates, which suggested that multiple patterns can co-exist across different cells. This finding raises the question, which we will address later, of the nature of the underlying mechanism that controls train structure in relation to the LFP.

To further characterize the relationship between cell discharge and LFP oscillation, we observed how the discharge of cells that exhibited a phase-locked pattern during a gamma oscillation evolved before, during, and after the oscillation. First, for all cells exhibiting the same type of pattern, the cell instantaneous frequency, which was defined as the inverse of the preceding ISI, was plotted at each spike time (see Fig. 4, panels A1 to A6 for the different types of patterns, time 0 being, in all cases, the onset of gamma oscillations). This representation showed that the 3:1, 2:1, and 1:1 experimental patterns (Fig. 4A1-A3) were characterized by stable instantaneous frequencies during gamma episodes, whereas highly variable discharges could be observed before and after gamma episodes. Hence, the regular discharges observed for these patterns seemed to be due to a specific process that occurred during gamma oscillations and not due to previous stability. On the other hand, the instantaneous frequency of the 2:3, 1:2, and 1:3 experimental patterns (Fig. 4A4-A6) exhibited a smaller decrease in variability between the “before” and “during” gamma oscillations, which suggested that the detected regularity was more intrinsic to MC discharge and less due to the oscillation. Finally, these results were compared across the different q:p patterns the mean (Fig. 4B1) and the standard deviation (Fig. 4B2) of the firing rate estimated on a 50ms time bin. Interestingly, phase-locked cells adopted a pattern that had an average firing rate that was close to their own average firing rate before the oscillation (except for a small mismatch between 2:3 and 1:2 patterns). For all types of patterns, the instantaneous frequency standard deviation decreased immediately after the onset of the gamma oscillation. Overall, this suggests that gamma oscillations can regularize the discharge of MCs while segregating them according to their intrinsic firing rate (i.e. cell firing rate if the oscillatory input are absent).

Phase-locked patterns are reproducible

Given that pattern formation is observed during gamma bursts, we aimed to evaluate the correlation of pattern presence with odor specificity and physiological relevance. We compared the reproducibility of the pattern formation of the neuronal response during stimulation with the same odor and a different odor.

The probability of finding the same pattern in an MC response was significantly higher for responses to the same odor than for responses to different odors (probability of finding the same pattern in response to the same odor: 0.049, to different odors: 0.015, p-value<0.05, paired t-test, n=98, see the distribution of these probability differences computed for each cell in Fig.10F). This test was performed on 98 cells among 143 cells. We selected the cells for which there were at least two recorded responses for at least two different odors. Further investigations on our data at this point could not lead to fully determine the role of locking. Nonetheless, this result reinforces the possible significance of patterns for encoding information about the nature of the odor and could help decoding by other structures. Although further analysis with additional data will be necessary to obtain a full understanding of the patterns’ physiological function, these patterns were found to be related to odors in a relative reliable manner.

Part II: modeling study

The relationships between unit activity and gamma LFP oscillations during phase-locking raise the question of whether reciprocal entrainment mechanisms exist between MC and LFP oscillations. We addressed one part of this question using a biophysical model 1) to investigate the modalities of entrainment of MC activities by granule cell activities and 2) to explain the experimental results with a quantitative approach. The use of a model allowed us to perform studies that are not currently feasible with animal studies.

Model MCs can be differentially phase locked by an oscillation of their inhibitory input

Before presenting our results, we needed to characterize, the physiological conditions of locking. Correlation between LFP oscillations and spiking patterns presupposes neither the cause-effect relationship between the two activities nor the biophysical mechanisms of interactions in the bulbar network are able to explain the phase-locked patterns. In vitro experimental results by Lagier and colleagues (2004) [24] (see their Fig. 4G) showed that, during LFP gamma oscillation, MCs can receive an average level of inhibition due to tonic activation of GABA_A receptors, along with a superimposed phasic inhibition that occurs at gamma frequency. From the synaptic connectivity and the individual synaptic strength, we were able to estimate the average level of tonic inhibitory conductance (called g_i) to be on the order of 20 S/m² and the amplitude of the oscillation (i.e. the phasic inhibitory conductance, called g_{io}) to be up to 30% of the average level (see Methods Fig. 11 for details about the MC model and all of the parameter estimations). We tested how the response to sensory inputs, which was mimicked by a constant and tonic excitatory conductance (called g_e), was influenced by the inhibitory sinusoidal conductance ($g_i + g_{io}$) oscillating at a frequency (f_{osc}) in the gamma range (Fig. 5A). This inhibitory conductance oscillating at 60 Hz was set to 0%, 10%, or 30% of the average inhibitory conductance g_i (i.e. $g_{io} = 0, 2, \text{ or } 6 \text{ S/m}^2$, respectively). As shown by the different plateaus on the curves of the cell response (Fig. 5A1), the occurrence of such an inhibitory conductance stabilized the firing rate. The exact frequencies at which the firing rate was stabilized corresponded to the p/q ratios (or p spikes per q gamma cycles) multiplied by the frequency of the imposed oscillation (60 Hz). q and p are prime numbers between each other and are chosen among [1 2 3]. These frequencies corresponded to frequencies in the experimental phase-locked patterns. The larger the oscillation amplitude, the wider the stabilized plateau (see the curves from blue to green in Fig. 5A1). Interestingly, the inhibitory oscillation was able to increase the firing rate (the plateau for 1:1 lies above the curve with $g_{io} = 0$) and could evoke firing in a silent cell (Fig. 5A1). Under noisy conditions (Fig. 5A2), the conductance-frequency response was partially preserved, but the smallest plateaus (for 2:1, 2:3, and 1:3) disappeared. Figure 5B1 shows, in the noiseless case, phase diagrams of trains that were extracted from each plateau that was mentioned in A.1 (referred as “a”-“e”). The relatively good agreement with experimental observations [e.g., compare experimental spike trains in Fig. 3B with simulated trains in Fig. 5B] suggests that MCs can be driven effectively by an oscillatory input during gamma oscillations. Additional spike trains that were extracted from the non-plateau portions of the firing rate response curve (referred as “f”-“j” in Fig. 5A1) are shown in f through j of Fig. 5B. These results indicate that MCs are entrained by an oscillatory inhibitory conductance mainly when the neuron fires at the same frequency as the imposed 60 Hz oscillation and that this entrainment can also explain the patterns that are observed in our experiments. This result is partly specific to the model, since other intrinsic properties for other neurons would not lead to a 1:1 entrainment. Indeed, all cochlear neurons have dissimilar entrainment properties with regard to the frequency of entrainment [31].

We next analyzed the influence of the oscillation amplitude on spike phase-locking. For this purpose, a colormap was used to plot the phase jitter, which was defined in the same way it is used to classify spike trains as a phase-locked pattern or not, as a function of the amplitude of the oscillating inhibitory conductance, from 0 to 30% of the average inhibitory conductance (y-axis), and the amplitude of the MC excitatory input conductance (Fig. 5C1). The so-called “Arnold tongue” for 1:1 [32] (zero jitter, which would occur in perfectly locked spikes, in black and noted directly on graph) was the widest, while the tongue for 1:2 was the second widest. The higher the oscillation amplitude, the wider the tongues were for 1:1 and 1:2. These tongues were partly preserved under noisy conditions (Fig. 5C2) but tended to shrink and disappear at low levels of oscillatory inhibition. As a consequence, when the oscillation amplitude tends to increase, a higher proportion of cells may be entrained by the oscillation,

even if the cells' intrinsic frequency is far from the frequency that is imposed by the entrainment (see the doubled x-axis, below). Therefore, a larger MC population can be recruited when the oscillation amplitude increases.

The next step was to understand the origins of the inter- and intra-pattern phase variability. For this purpose, we represented the spike phase variations according to the driving excitatory conductance g_E for two levels of inhibitory conductance, which were 10% (Fig. 6A1) and 30% (Fig. 6A2). Under these noiseless conditions, the 1:1 tongue (arrows) had phases that varied continuously from 0.5 to 0.2, as the excitatory conductance increased. We noticed that the range of possible phases for each tongue was not greatly affected by the oscillation amplitude, whereas the conductance range (the g_E band indicated) over which the MC was entrained increased with the oscillation amplitude (compare Fig. 6A2 to 6A1). Phase-locking was robust to noise, and the phase distribution persisted, although less sharply, for high levels of noise (Fig. 6A3). The model supported the experimental observation that MCs can be phase-locked at various frequencies and under noisy conditions. Finally, comparing the model prediction to our experimental results at the population level is impossible because of the lack of data that described the distribution of the input excitatory conductance, g_E , in the MC population. Thus, we present in Fig. 6B only side-by-side comparisons of the spike phases that predicted by the model for each type of pattern and their experiment counterparts. We observed a very good agreement between theoretical and experimental data but with a much higher dispersion of spike phases in the experimental conditions. The latter can be explained by the variability of the gamma phase that was recorded from different locations and that will be further discussed later.

Synaptic input parameters governing the entrainment

Having shown our model can reproduce our experimental results well, we further used it to explore how MC entrainment should depend on network parameters or MC intrinsic parameters.

a) The excitatory-inhibitory balance

The level of inhibition received by an MC is not known, and it is difficult to infer using standard experimental approaches (see estimation in the Methods). It may vary within a range depending on the level of recurrent, lateral, and centrifugal inhibition that are present in the OB network, and these networks are highly variable and modulated in their nature and function. To explore the consequences of the average inhibition for the entrainment, in noiseless conditions, we set the level of background inhibition to different values ($g_I = 6, 20, 100 \text{ S/m}^2$). This range of values corresponded to the range of influence, going from a small effect to a complete shunting effect on the spiking activity. We then measured the entrainment for the 1:1 tongue by representing the entrainment diagrams as a function of MC excitatory input and the inhibitory oscillation amplitude (see Fig. 7A). The 1:1 tongue grew wider as the average level of inhibition increased. The tongue width as measured by the g_E band (Fig 7A) and computed with an oscillation amplitude of 2 S/m^2 that increased with the average inhibition level (Fig. 7B, full black line, left y-axis). Alternatively, a given set of conductances (g_E, g_I) corresponds to a given MC firing rate, and, thus, the g_E band can be converted into a f-band that describes the range of firing rates (in absence of oscillation) at which the MC are entrained by the inhibitory oscillation in a 1:1 pattern. Again this f-band width increases with the average inhibition level (Fig. 7B, full grey line, right y-axis). These results were robust under noisy conditions (see dashed lines in Fig. 7B). Taken together, these findings reveal that a higher level of background inhibition of MCs makes them more capable of being entrained.

b) An oscillation frequency in the gamma range is optimal for entrainment

Experimental data showed frequency stability in the LFP oscillation around 60.7 Hz (Fig. 1D). Since the frequency of gamma oscillations varied little under our experimental

conditions, as well as under other conditions [14,27], we wondered why the frequencies had these particular values. We tested how the model reacted to other imposed frequencies (f_{osc}) of the inhibitory conductance ranging from 5 to 120 Hz and then analyzed zones for which the MC model was entrained, according to both its intrinsic firing rate and the frequency of the oscillation. Such zones are represented for the 2:1, 1:1, and 1:2 tongues in Fig. 7C. These results demonstrate that the MC models can be entrained by any frequency oscillation in a 1:1 pattern, as long as the oscillation frequency is close to the intrinsic firing rate of the MC. This relationship is reflected by the fact that the 1:1 tongue covers the diagonal $f_{osc}=f_{intrinsic}$ in the graph in Fig. 7C. More noticeably in the case of the 1:1 tongue, the bandwidth (f-band) was largest when f_{osc} was in the 40-60 Hz range. In contrast, for the 2:1 and 1:2 tongues, the maximal entrainment was observed for oscillation frequencies around 120 Hz and 30 Hz, respectively, which corresponded to an MC intrinsic firing rate of about 60 Hz in both cases.

We further explored the broader range of entrainment that was observed when the MC intrinsic activity was close to 60 Hz. Due to the importance of the 1:1 pattern in both the experimental and simulated results, we focused on the frequency band (f-band) of the 1:1 tongue. The bandwidth is represented as a function of the oscillation frequency in Fig. 7 (D, black thin line). When the amplitude of the oscillation was varied from 5% to 10% of the global inhibition level, the peak at around 60 Hz persisted. Varying the average inhibition level (g_I) or adding some noise to the system did not change the position of the peak around 60 Hz. These results indicate that MCs may be preferentially entrained by oscillations at 60 Hz and that it is robust to variations in the parameters for synaptic stimulation of MCs.

The last step was to explore how the intrinsic properties of the MC model were potentially responsible for the 60 Hz preference. For that, we varied the time constant of the slow potassium channel, which was responsible of the MC model subthreshold resonant properties (Fig. 11), from 7 ms to 13 ms. We observed that the peak of maximal entrainment could drift from lower to higher frequencies when this time constant was decreased from 13 to 7 ms (Fig. 8). We concluded that the intrinsic properties of the MC model may be responsible for the gamma-range frequency preference for entrainment. Although it is not currently possible to experimentally alter the intrinsic properties of the neuron, the model that we used in this study demonstrates that the intrinsic properties of the MCs can interact with network properties, thereby leading to specific entrainment of MCs, the consequences of which will be discussed later.

Discussion

Herein, we reported that MCs produced spike trains that were locked to the 60-Hz gamma LFP oscillations in specific patterns. Such locked cells exhibited particular firing rates that were stabilized by the occurrence of gamma oscillation. In most cases, the firing rate was one spike per cycle (SpC). Using an MC model that was based upon a small inhibitory 60Hz sinusoidal conductance, we showed that these observations were characteristic of an entrainment process.

The model exhibited similar phase-locked patterns of entrainment, with maximal entrainment for 1-SpC patterns. Spike phase distributions were similar in the model and experimental data and corresponded to the minimum inhibitory conductance of LFP oscillation. This model suggests that there is an efficient process of entrainment in the OB that can make MC activity coherent across various OB areas during gamma oscillations. The relevance of such a mechanism is in the possibility to ensure an underlying basis for neural assembly formation that can be used more generally by the nervous system [33].

The use of a robust biophysical model allowed us to predict the optimal conditions for an entrainment occurrence:

- (i) if the chemical features of the odor belong to the chemoreceptive field of an MC, such that its excitatory response will be strong enough to elicit spiking;
 - (ii) if there are strong tonic network inhibitory interactions that are generated, which are intrinsic to the bulb and/or generated by the cortex feedback, such that they will balance this excitation and will, therefore, provide what is called a level of background inhibition; and
 - (iii) if the distribution of the IPSCs that are received by the MC is sufficiently well phased, which would lead to a sufficiently large oscillating conductance,
- then an MC has a good chance to be entrained and locked into the oscillation. As a result, its spike phases become tightly controlled by the oscillation.

Contribution of our work to existing experimental data

Our work provides the first evidence that MCs can adopt typical phase-locked discharge patterns that suggest the existence of an entrainment mechanism in the OB *in vivo*. Even if several groups in the past have been interested in the temporal relations between spikes and LFP, none has gone so far in the exploration of this phenomenon. Indeed, Eckmann and Freeman [23] could not perform a similar analysis because of the multi-unit nature of their signal. Kashiwadani et al. [27] did not explore the possibility of phase-locking patterns in their data. Furthermore, using an artificial sniff, gamma oscillations did not occur at a precise time in their model, as we observed in the naturally breathing animal. Several *in vitro* studies asked the question of spike/LFP relationships [24]. However, all of them reported spike phase distributions on the whole, without precisely exploring either the parameters that favored phase-locking or the existence of phase-locking patterns.

One potential criticism of our work is the usefulness of such a mechanism in some behavioral conditions, such as where odor presentation produces a decrease in gamma oscillations [19]. The fact that the amplitude of gamma oscillations decreases in particular conditions does not signify that gamma oscillations are unnecessary for the system. Indeed, they decrease in that particular condition, but meanwhile, beta oscillations are enhanced, which suggests that the olfactory bulb and cortex together work in a different way [21,34]. Other behavioral conditions exist where gamma oscillations do not decrease but rather increase with odor presentation [14]. Experimental conditions are very different according to the paradigm that was used, and this can induce different sniffing strategies [16] or different neuromodulatory control of the mitral/granule loop [35]. These different conditions are certainly responsible for the variation in the expression of gamma and beta oscillations. The aim of our study was to explore how spikes and oscillation can be phase-locked in the more general situation where gamma oscillations are present. It will be interesting in a second step to perform the same

study for beta oscillations and to look for another mechanism that could be responsible for the observed spike/beta oscillation synchronization [36].

Basis of the model and neural mechanisms

Our MC model was fitted to reproduce the quantitative and dynamic properties of MCs, based upon recent findings of the MC membrane activity. It is consistent with experimental data [11,24,37,38] and with essential features of existing models [9,11,39]. The synaptic mechanisms hypothesized in our model are based upon fundamental observations that were made by Lagier et al, (2004) [24], who reported that a fraction of the IPSPs received by the MCs were phased relative to gamma oscillations. Other possible mechanisms that could affect the MC membrane potential during gamma LFP oscillations have been proposed: (1) a synchronous inhibition resulting from GABA release from astrocytes [40], (2) a synchronous excitation of the MCs by glutamate spillover onto lateral dendrites [41,42], and (3) a direct influence of the LFP on membrane voltage [43,44]. Of these possible explanations, the functional and dynamic relevance of the interactions between MCs and GCs [45] are the most likely processes to occur during gamma oscillations.

Aside from this observation, it is notable that the time constant of the single inhibitory inputs does not play a role, since it is the frequency of the oscillatory modulation of the whole inhibitory input that imposes the locking frequency.

It would be important to insert this mechanism in a more realistic model in order to take into consideration the spatial distribution of the physiological mechanism in dendrites. The presence of high frequency burst of spikes in MCs is probably not due solely to the excitatory drive from the sensory input but also to additional conductance when compared to those that were present in the model. For example, the activation of intrinsic conductance such as T channel would facilitate the emergence of high frequency bursts like those in our recordings.

Model predictions and experimental recordings explanation

Neuron phase-locking and pattern formation have already been described both theoretically [32,46,47] and experimentally [33,48]. However our study is the first done in the context of the OB with a resonant neuron, and it has shed light on important aspects that are specific to this system.

First, the simulation results provide some precision and explanations regarding electrophysiological properties that are not directly accessible by experimentation. (1) The phase of MC spikes relative to LFP oscillations is precisely distributed in the $\frac{1}{4}$ to $\frac{1}{2}$ part of the LFP cycle due to their level of synaptic drive. Phase distributions extracted from simulated data (Fig. 6) are more precise and go beyond the data that was obtained in the OB [18,24,27], as well as our own experimental results. Here we want to emphasize that our experimental measure of the phase of the gamma oscillation was not totally reliable from one location to another and could have up to $\frac{1}{4}$ of the cycle of phase shift. Indeed LFP gamma oscillations are generated by membrane currents flowing on either side of the MC layer, and simultaneous recording of a gamma oscillation shows a $\frac{1}{4}$ cycle phase shift when it is recorded up to 100 μm from the MC layer. Our recordings aimed at maximizing the number of recorded MCs and were thus as close as possible to the MC layer, but we could not control for the exact position of each electrode. As a consequence, this recording constraint is likely at the origin of the larger spread of phases during the phase-locked experimental pattern when compared to the model prediction (see Fig. 6B). This can also explain the small discrepancies with recordings from other studies in which the LFP recording location was different or more precisely controlled [23,24,27]. However, in all cases, our results are still qualitatively comparable. Second, different levels of excitatory conductance in the model were predicted to induce a slight phase lag (corresponding to ~ 5 ms) between the neurons, as shown in Fig. 6. This lag is observed in the cross-correlograms that were presented by Kashiwadani et al.

(1999) [27] (their Fig. 5A), and it may be achieved by differential activation of the glomerulus [27,49,50]. Our predictions are able to explain the result of this previous study.

The model predicts that phase-locked or residual spike trains may depend on the degree of detuning (i.e., the difference between the neuronal intrinsic frequency and the external network frequency), the strength of coupling, and the level of noise. The continuity between the locked and residual spike trains suggests that entrainment of MCs may be fine-tuned during the gamma oscillation and may corroborate the locking that was observed in the fish OB [18].

Dynamic constraints governing entrainment

In our model, the conditions for maximal entrainment (1:1 tongue) rely on a phased, weak synaptic inhibitory conductance that oscillates at a frequency close to the MC activity. In such cases, when a weak synaptic input influences the neuron, the phase response can be predicted from the phase response curve (PRC) [51,52], particularly for a sinusoidal input [53]. Since the PRC of our MC model agrees with the experimental PRC [54], our model is likely to accurately predict MC response to such a synaptic input.

Our results raise the question of how the MC coherence influences the LFP at frequencies close to 60 Hz. A self-synchronization mechanism [46,55] that relies on direct weak coupling between MCs may explain the MC coherence at a given frequency. In the OB, however, MCs are directly interconnected only within glomerular parts [56-59] and not across bulbar areas. Instead, MC spikes induce depolarization of GC spines, which propagates through parts of the cell to other spines and triggers both synchronous [60-64] and asynchronous [57,65-68] GABA release from granule dendrodendritic synapses onto other MCs at about $\frac{3}{4}$ of the gamma cycle (≈ 12 ms) after the spike (according to the phase distribution plot depicted in Fig. 4 of [24]). The slow component of inhibition [57,67-69] may contribute to the global tonic inhibition level that is present in the OB. This synaptic activity is likely to explain the nature of MC-MC coupling during gamma oscillations, since the inhibition is the most likely mechanism of interaction between MCs. As predicted by the model (according to Fig. 7), entrainment is maximal at the gamma frequency. If the MC spiking frequencies were heterogeneous (see Fig. 4), MCs firing within an intrinsic frequency band of 40-70 Hz would tend to be better entrained than MCs firing at lower or higher frequencies. A large part of the MC population would, therefore, be entrained around 60 Hz. This hypothesis of gamma emergence is the first to take into account precise *in vivo* experimental data in the OB, thus constituting an improvement over previous models. Indeed recent gamma oscillation models either restrain their model to a very particular property of mitral cell that is for instance the stochastic synchrony [11] or apply to particular case of *in vitro* recordings in which the gamma oscillation is continuous and evoked by single stimulation [9]. Another specificity of our model is that it relies on the IPSPs time distribution and intrinsic properties of MC instead of IPSP time constants or connectivity.

In our model, conductance level (Fig. 7) is expected to control the entrainment and to favor it when the balanced excitatory-inhibitory conductance is maximal. This prediction is in agreement with results from studies that showed that neurons are more sensitive to small synaptic inputs when they are submitted to intense synaptic bombardment [70]. Under anesthetized conditions, the maximal conductance should be directly related to the maximal activity of the peripheral excitation [50,71] and to the maximum of synaptic inhibition [72], which corresponds to the inspiration/expiration transition. This relationship would explain why the gamma wave appears around this point (Fig. 1). Interestingly, odors that elicit low θ activity (respiratory modulation), which potentially reflects weak OB activation (e.g., low-concentration odors), generally failed to elicit gamma oscillation [13], which suggests that θ oscillation could gate gamma activities.

Coding implications

Other studies in anesthetized rats have shown that MCs can segregate into two populations according to whether they lock on gamma oscillations or beta oscillations, which is probably due to their position relative to the receptive field of the odor [36]. Here, we show that, among MCs that lock to the gamma oscillation, locking is finely tuned depending on the various conditions that control MC entrainment. Therefore, some of the MC population can be entrained and phase-locked at gamma frequencies with patterns depending on the MC intrinsic firing rate, which is similar to the previously described rate-specific synchrony [33]. The resulting phase-locked activity map may overlap with the glomerular activity map. This is suggested by our results which show that patterns are statistically reproducible for a same cell and same odor. The glomerular map is probably forwarded to MC as a "rate code" map readable by downstream structures. However, the phase-locked activity map appears to be more elaborate than the simple glomerular map. Particularly, the main characteristic of the phase-locked activity map is that it can be modulated by various parameters: the conductance-level (Fig. 7), MC intrinsic frequencies (Figs. 4 and 5), and the degree of GC-MC coupling (Fig. 5C). Therefore, this phase-locked activity map is probably modifiable by plasticity mechanisms and central control [14]. Based on the adjustment of the spike phases, the mechanisms described here would result in population activity that is readable by decoding structures which function as coincidence detectors. Pyramidal cells of the piriform cortex probably have such detection properties [73]. In addition, synaptic integration by pyramidal dendrites is more sensitive to pattern-like inputs, as shown in other sensory systems [74,75]. Thus, our model of a phase-locked map of MC activities across the OB supports the idea developed by Buck et al [76], who hypothesized that pyramidal cells could integrate odorant features using a combination of coincident MC inputs (as argued also in [77]) in a way similar to the mushroom bodies of insects [78,79].

Methods

Preparation and recording

Male Wistar rats (150-350 g) obtained from Charles River Labs (L'Arbresle) were anesthetized with urethane (i.p. 1.5 mg/kg, with additional supplements as needed) and placed in a stereotaxic apparatus. All experiments were performed in accordance with the guidelines of the European Communities Council. The dorsal region of the OB was exposed. Bulbar activity was recorded as a broadband signal (0.1-5 kHz) using 16-channel silicon probes (NeuroNexus Technologies, Ann Arbor, MI) with a homemade, 16-channel DC amplifier. The data were digitally sampled at 10 kHz and acquired on a PC using the IOTech acquisition system (Wavebook, IOTech Inc., Cleveland, OH). Probes were placed in the lateral or medial part of the OB at a depth that maximized the number of channels located in the mitral cell layer (MCL). The respiration signal was recorded using a homemade flowmeter based on a fast response time thermodilution airflow sensor. Odors were delivered through a dilution olfactometer (440 ml/min). The recording protocol was as follows: 5 s of spontaneous activity, 5 s of odor-evoked activity, and 5 s of post-stimulus activity. Each sampling included stimulation by simple linear aliphatic compounds. The varying features of odorants were either the number of carbons in the main chain (chain length: 5, 6, 7 and 10 C) or the functional group associated with the chain (alcohol, ester, aldehyde or ketone). Additional odors have been used, including isoamyl acetate, p-cymene, and eugenol. All odors were delivered in front of the animal's nose at a fraction of $18 \cdot 10^{-2}$ of the saturated vapor pressure. The time delay between each odor presentation was at least one minute.

Data processing:

Respiratory signal.

The signal was processed as previously described [80]. Briefly, respiratory cycles were extracted, and, for each one, the time was converted into a phase that had a value that varied as $[-\pi, 0]$ for inspiration and as $[0, \pi]$ for expiration. The transition point between inspiration and expiration (I/E) corresponded to the 0 phase, which was detected as the point where the signal crossed the 0 value and which corresponded to the point where there was no variation in pressure.

LFPs.

LFPs were obtained by band-passing the recorded signal at 5-200 Hz. To preserve both time and frequency information, we used a time-frequency representation (TFR) that was based upon continuous wavelet transformations, as previously described [81]. Briefly, the LFP signal was convoluted by complex Morlet's wavelets [82] with a time resolution of 5 ms and a frequency resolution of 1 Hz. Using a wavelet ridge extraction method coupled with a high time-resolution TFR, each gamma oscillatory epoch of the LFP was extracted using an energy threshold to detect its beginning and end. This procedure allowed a reasonable estimation of the phasic, temporal, and frequency features of these oscillations. The TFRs were normalized to the energy measured during the spontaneous activity in the 5 s before odor presentation.

Spikes.

Signals from individual electrodes were amplified (gain 1,000X) and filtered from 300 to 5000 Hz. Multiunit activity consisted of a few neurons on each electrode. Spikes were clustered off-line using a semi-manual routine. We chose to use only the units that showed a signal/noise ratio ≥ 5 and to sort cells according to their spike amplitude. Consequently, the number of units that were retained for analysis was restricted to 1-3 per electrode. This conservative procedure resulted in the analysis of a relatively limited number of units but provided high quality data. Additional details of the method are given in Cenier et al. [36]. Moreover, autocorrelograms of spike trains that belonged to presumed single units confirmed that a refractory period exists and precluded the possibility to have multiunit recordings

included in our single unit ones. The ISI histogram in Fig. 1-F shows this refractory period at the population level.

Spike phases.

To study relationships between spike and LFP, (these were always recorded from the same electrode), we converted spike times into phases that were computed in cycle units (i.e., the phase increased by one at each cycle) during each LFP gamma oscillation epoch. This change in the time axis allowed the interspike interval (ISI) (respective firing rate) to be measured in cycle units (respective spike per cycle (SpC)). Using phases instead of time allowed us to discard temporal or frequency irregularities across oscillatory epochs.

Statistics:

Phases.

For a given ensemble of spikes (N) with relative phases $\{\varphi_n\}_{n=1,\dots,N}$, the phase distribution was represented as a histogram (bin size: 0.02 cycle). To analyze this distribution, we used circular statistics [83]. The mean phase $\bar{\varphi}$ is defined by:

$$r e^{i2\pi\bar{\varphi}} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N e^{i2\pi\varphi_n}. \quad (1)$$

The circular standard deviation uses the modulus (r) of this sum and is given by $s = \sqrt{-2\log r}$. The value of r increases from 0 to 1 as the phase distribution changes from being uniform to sharply peaked.

A Rayleigh uniformity test was used to calculate the probability that the data were uniformly distributed (null hypothesis).

Using, $p = e^{-Z} \left[1 + (2Z - Z^2) / 4N - (24Z - 132Z^2 + 76Z^3 - 9Z^4) / 288N^2 \right]$, with $Z = N^3 r^2$, the level of significance for non-uniformity was set at a p-value < 0.001 [83].

Interspike Intervals.

The interspike interval (ISI) distribution was compared to the density function of a random variable process following a gamma distribution that was reconstructed in order to have the same mean and a random refractory period (with a Gaussian distribution that had a mean of 3 ms and the standard deviation at 1ms, such that the refractory period is sorted each time the sorted ISI falls below the refractory period [84].

In addition, we considered both the instantaneous frequency, which was defined for each spike as the inverse of the preceding ISI, and the mean firing rate, which was given by the average number of spikes that fell within a time bin of 50 ms.

Detection and classification of phase patterns

Summary of pattern definition.

In this study, our aim was to quantify the different proportions of "phase-locked spike trains" in our experimental data. Therefore, we quantified each category of q:p patterns, where q = number of oscillation cycles and p = number of spikes. For this purpose, we used an automatic detection method to determine the limits that defined a q:p pattern. A scheme of this method is presented in Fig. 9. Briefly, the method consisted of measuring the closeness between experimental spike trains and perfectly phase-locked theoretical q:p patterns. In measuring this closeness, the method took into account two parameters:

- (1) the **relative distance**, which was based only on the difference in the number of spikes between the experimental and theoretical spike trains during each oscillation cycle;
- 2) the **phase jitter**, which measured how well the experimental spikes were phase-locked (based on their position in the q:p pattern).

An experimental spike train had to fall within strict limits for these two parameters to qualify it as a "q:p phase-locked" pattern (see the next section for additional details about those measures).

This method of detection was also used for trains produced by the simulations in Fig. 5. In this case, to optimize pattern detection and minimize random noise in the jitter, we used phase trains lasting 50 cycles (cases without noise) or 100 cycles (cases with noise) in Figs. 7 A, B, while 10-second spike trains were used in Fig. 7C, D and in Fig.8. A simplified and stricter constraint on the distance was set by measuring the firing rate, if this did not exceed 2% of the firing rate of the pattern, and a simplified constraint for jitters was set if the standard deviation of phases of all first spikes of each cycle did not exceed 0.05 cycle, which allowed us to more rapidly detect the edges between locked and unlocked zones.

Details of the method for pattern detection.

Each spike train [observed both in the experimental results and model (described later)] was represented as a sequence of spike phases (step1, Fig.9). From experimental observations, six types of patterns were described for the q:p categories, which were the p spikes per q cycles (q and p are prime numbers between each other and are chosen among [1 2 3]): 3:1, 2:1, 1:1, 2:3, 1:2, and 1:3. In these patterns, the phases were stable from one period to the next.

Each spike train was compared with all the different types of q:p patterns to find the closest one. This comparison occurred in two steps:

First, the distance between the spike train and a theoretical pattern was measured (step 2 Fig.9). The **absolute distance** is the number of cycles that differ in the number of spikes. For theoretical patterns with multiple spikes per cycle, the first and last cycles could be cut to best match the experimental spike train. This absolute distance was then normalized by the number of cycles over which the spike train spread to obtain the **relative distance**, which was comparable across spike trains. Mathematically, this relative distance can be written as:

$$d = \frac{\sum_{c=1}^C \delta_{nPA_{exp}(c), nPA_{pat}(c)}}{C} \quad (3)$$

where C is the total number of oscillation cycles, $nPA_{exp}(c)$ and $nPA_{pat}(c)$ are the number of spikes during the cycle c in the experimental and theoretical patterns respectively, and δ is the dirac function that equals 1 when both indices are equal.

The relative distance was computed for all types of theoretical patterns, and only the patterns that had a distance $d < d_{max}$ were further considered in the classification process. For all patterns, d_{max} was set to 0.33, which corresponded to an allowance of up to less than one-third of the cycles where there could be excess or missing spikes relative to the theoretical pattern.

The selected set of patterns was then submitted to a second round of selection (step 3 and 4 Fig. 9) based on a criterion of phase jitter between the experimental train and each pattern. The estimator of the jitter σ is given in Eqn (4):

$$\hat{\sigma}_{jitter} = \sqrt{\frac{1}{(N-K)^{pow}} \sum_{i=1}^N \left(\frac{\varphi_i - \bar{\Theta}_J}{\sigma_K} \right)^2}, \quad (4)$$

J = 1, 2 or 3 is the index of phase position for a pattern

where N is the total number of spikes in the train, φ_i is the phase of each spike, $\bar{\Theta}_J$ is the mean phase of the spikes that correspond to position J in the theoretical pattern cycle (thus it is different for spikes that corresponds to different positions), and σ_K is a normalization factor to compensate for patterns with multiple spikes in a single cycle, with σ_K equal to the standard deviation of a uniform distribution of a single spike in a 1/K cycle fraction, where K is the

maximal number of spikes in the pattern cycle. The formula is slightly adapted for 2:3 patterns: the denominator $N-K$ take the value $N-3$ in order to take into account the degree of liberty that is when phase can vary on 3 different positions and σ_K changes according to the number of spike in each cycle. The parameter pow is equal to 1.5 and serves to adjust the formula so that it favors the detection of long trains. The theoretical pattern to be associated with the experimental train was the one with the smallest jitter among those that satisfied the distance constraints given in Eqn (1). If two theoretical patterns showed the same jitter, the one with the smallest distance was selected. The jitter limit was set to 0.5 for the phase-locked patterns. In the presented data, the spike trains that spread over at least three gamma cycles are shown, and the results were similar when spike trains spreading over at least two cycles were also examined. Some examples of residual spike trains are given in the bottom of Fig. 9.

In short, our database consists of 2189 simultaneous recordings of LFP-gamma bursts that are associated with spike trains of various lengths. Other recordings where there were neither spikes nor gamma oscillations were discarded. Among the spike trains, 1210 had strictly more than 1 spike, and 898 spread over at least 3 LFP gamma oscillation cycles. These spike trains were recorded in 143 different mitral cells. Spike train distribution per cell and per odor is provided in Fig. 10 A and B, respectively. The pattern study is performed on spike trains that cover at least 3 LFP gamma cycles. Detected pattern distribution over the recorded cell population and tested odor is given in Fig. 10 C and D, respectively. Finally, the individual cell contribution to the detected patterns is given in Fig. 10 E.

Random spike trains.

To assess the significance of the phase-locked patterns, we compared our experimentally recorded spike trains to a set of computationally controlled random spike trains. For each experimentally observed spike train, we drew and sorted a family of 100 spike trains using a Poisson process with the same mean firing rate but with an imposed minimal interspike interval of 1/4 of an oscillation gamma period, which corresponded to a refractory period of about 4 ms (similar to what is observed experimentally). This refractory period was reset to 0 in the few cases where firing rate of the observed spike train could not allow a refractory period as large as 4ms. We verified that experimental and random ISI distributions were in good agreement. Each random spike train had the same number of spikes as the experimental one. Finally, the sorting of random spike trains used the same procedure as described for the experimental pattern detection. The number of spike trains generated (100 times the number of experimentally observed spike trains) was sufficient to obtain smooth distributions when compared to experimental ones.

MC model.

The MC model was derived from a previous study [9], which was derived in turn from [85]. The model uses parameters from [86,87]. Its essential features are (1) spiking activity through sodium spikes, (2) bursting activity (Fig. 11 A), (3) its current-frequency response (Fig. 11 B), (4) resonant properties as revealed through sub-threshold oscillations (Fig. 11 C), and (5) phase response curve (Fig. 11 D). The method to extract the resonance frequency is to linearize the system around its equilibrium for a given membrane potential and to compute the frequency from the imaginary part of the eigenvalues ($1/(2\pi \cdot \text{imag})$). The method to compute the phase response curve [52] was to impose a small instantaneous voltage deviation along the period of spiking (here equal to 25ms).

We reduced the number of variables in the model from nine to four by removing each of the variables individually and checking that the simpler model retained the essential features listed above; at the same time, some of the parameters were adjusted as necessary. The main characteristics were preserved as depicted in Fig. 11. The remaining variables were the membrane potential (V), the activation gating variable of the fast rectifying potassium current (m_{Kf}), the activation gating variable of the slow potassium current (m_{Ks}), and the inactivation gating variable (h_{Ks}). The dynamics are described in Eqs. 5-8:

$$\begin{aligned}
C \frac{dV}{dt} = & -g_L(V - E_L) - g_{Na} m_{\infty, Na}^3 (V - E_{Na}) \\
& - g_{NaP} m_{\infty, NaP} (V - E_{Na}) - g_{Kf} m_{Kf} (V - E_K) \quad (5) \\
& - g_{KA} \bar{m}_{KA} \bar{h}_{KA} (V - E_K) - g_{Ks} m_{Ks} h_{Ks} (V - E_K) \\
& + I_{syn}
\end{aligned}$$

$$\frac{dm_{Kf}}{dt} = -\frac{m_{Kf}}{\tau_{Kf}^m} \quad (6)$$

$$\frac{dm_{Ks}}{dt} = \frac{m_{\infty, Ks} - m_{Ks}}{\tau_{Ks}^m} \quad (7)$$

$$\frac{dh_{Ks}}{dt} = \frac{h_{Ks}^{\infty} - h_{Ks}}{\tau_{Ks}^h} \quad (8)$$

I_{syn} is the synaptic current and is detailed later. The gating variable parameters are given by:

$$m_{\infty, Na} = \frac{a_{Na}^m}{a_{Na}^m + b_{Na}^m}; \quad a_{Na}^m = 0.32 \cdot \frac{V + 50}{\exp(\frac{V + 50}{4}) - 1}; \quad b_{Na}^m = 0.32 \cdot \frac{V + 23}{\exp(\frac{V + 23}{5}) - 1};$$

$$m_{\infty, Nap} = \frac{1}{\exp(-\frac{V + 51}{5}) + 1}$$

$$m_{\infty, Ks} = \frac{1}{1 + \exp(-\frac{V + 34}{6.5})}; \quad h_{\infty, Ks} = \frac{1}{1 + \exp(-\frac{V + 65}{6.6})}; \quad \tau_{Ks}^m = 200 + \frac{220}{\exp(-\frac{V + 71.6}{6.85}) + 1}$$

$$\tau_{Kf}^m = 2.6 \text{ ms}; \quad \tau_{Ks}^h = 10 \text{ ms}.$$

The conductance of the maximal ionic channels was $g_{Na} = 500 \text{ S/m}^2$; $g_{NaP} = 1.1 \text{ S/m}^2$; $g_{Ks} = 310e \text{ S/m}^2$; $g_{KA} = 100 \text{ S/m}^2$; $g_{Kf} = 100 \text{ S/m}^2$. The leak conductance is $g_L = 0.1 \text{ S/m}^2$. We adjusted the global value of the product $\bar{m}_{KA} \cdot \bar{h}_{KA}$ to be 0.004 as an approximation of the average gating variable since individual variations in m_{KA} and h_{KA} would not affect our results given our simulation. The reverse ionic potentials are $E_K = -70 \text{ mV}$ and $E_{Na} = 45 \text{ mV}$, and the membrane reverse potential is $E_L = -66.5 \text{ mV}$. The membrane capacitance is 0.01 F/cm^2 .

Synaptic Inputs.

In terms of amplitude, to assess the synaptic inputs that the MCs receive under in vivo conditions, the MC model input resistance was verified to be consistent with the order of magnitude of synaptic inputs that an MC actually receives. Experimentally, the input resistance of an MC was found to be $115 \text{ M}\Omega$ [88]. We assumed that a limited part of the total membrane area was responsible for the input resistance and that axial resistance (or intracellular resistivity) was negligible for this neuronal small portion. This portion included the soma and proximal dendrites and corresponded to 10% of the total area or $\sim 15.10^3 \mu\text{m}^2$ [89,90] given that, beyond a distance of about $100 \mu\text{m}$ from the soma on either the primary or secondary dendrite, synaptic inputs are not conveyed to the soma [91]. This experimental “effective” input resistance becomes $1.72 \Omega \cdot \text{m}^2$ when related to the membrane unit area. Our model is consistent with experiments since its input resistance measured at hyperpolarized membrane potential is $1.5 \Omega \cdot \text{m}^2$.

Previous studies have examined the kinetics of signaling to MCs and have found that MCs receive slow [68], fast, and asynchronous or simply fast inhibition from GCs [62]. In [24], it was reported that MCs receive weakly phased inhibition during gamma oscillation. From Fig. 4G of their report, we visually estimated that the amplitude of this phasic inhibition was up to

30%. The preferential phase of this oscillatory inhibition was estimated to be $359 \pm 9^\circ$ of the LFP oscillation, and it showed strong statistical significance ($p < 10^{-8}$ by the Rayleigh test). Therefore, based on these experimental observations, our model assumes that on average, MCs receive an input current of the form (Eq.9):

$$I_{syn} = (g_E + g_{Es}(t) \cdot \eta(t)) \cdot (V - E_E) + (g_I + g_{Is}(t) \cdot \eta(t) - g_{Io} \cdot \cos(2\pi ft)) \cdot (V - E_I) \quad (9)$$

which is composed of a baseline conductance, including constant excitatory (g_E) and inhibitory (g_I) conductances, as well as a sinusoidal part, i.e., the oscillating conductance whose amplitude is g_{Io} and whose frequency is f_{osc} . A white noise component was added to each excitatory and inhibitory component with amplitudes g_{Es} and g_{Is} , respectively, that were chosen to induce noise comparable to what is observed with in vivo intracellular voltage recording [88]. g_{Es} and g_{Is} vary proportionally with g_E and g_I in Figs. 5 and 6. g_{Es} is set to zero in Figs. 7 and 8. g_{Is} is set to $0.282 \text{ S}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{ms}^{1/2}$ in Fig. 7B and $0.141 \text{ S}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{ms}^{1/2}$ in Fig. 7D.

The reversal potentials of the excitatory and inhibitory synapses are $E_E = 0 \text{ mV}$ and $E_I = -70 \text{ mV}$, corresponding to the reversal potentials of AMPA/NMDA receptors and GABA_A receptors, respectively.

Inhibitory synaptic inputs can completely stop MC firing activity [49] and reshape the temporal organization of spike trains [62]. It was therefore appropriate for our model to take into account the levels of inhibitory conductance that could have such effects on MC activity. The maximum conductance of a single synaptic input has been estimated to be on the order of 1 nS [92,93]. A single MC has around 10,000 connections with GCs. As mentioned above, only about 10% of these inputs are conveyed to the soma [91], which corresponds to $\sim 1,000$ synapses. Such a limited integration of the total synaptic input is consistent with other studies [94,95]. Assuming that an MC receives inhibitory inputs from 1,000 synapses during every gamma cycle (period of $\sim 16 \text{ ms}$) and assuming an exponential time decay of 5 ms for GABA_A [62,72], it can be shown that, during the gamma oscillation, the MC average inhibitory input conductance is given by $1000 \cdot 1\text{nS} \cdot 5 \text{ ms} / 16 \text{ ms} = 312 \text{ nS}$. For the membrane area mentioned above, this represents $g_I = 20 \text{ S}/\text{m}^2$. g_E was adapted to reach a frequency up to 200 Hz , as observed in vivo. For example, Fig.11E shows a voltage trace of the MC model that is forced by the oscillation and that receives tonic excitatory and inhibitory conductances. The amplitude of the oscillatory component g_{Io} is discussed in the Results.

Simulations.

For a given input, MC activities were measured after at least one second of simulation to avoid transient effects. Euler integration was used with a time step of 0.02 ms . Simulations were performed using Matlab 7.0 (The Mathworks, www.mathworks.com).

References

1. Rinberg D, Koulakov A, Gelperin A (2006) Sparse odor coding in awake behaving mice. *J Neurosci* 26: 8857-8865.
2. Hromadka T, Deweese MR, Zador AM (2008) Sparse representation of sounds in the unanesthetized auditory cortex. *PLoS Biol* 6: e16.
3. Bi GQ, Poo MM (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 18: 10464-10472.
4. Cassenaer S, Laurent G (2007) Hebbian STDP in mushroom bodies facilitates the synchronous flow of olfactory information in locusts. *Nature* 448: 709-713.
5. Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R (2001) Modulation of oscillatory neuronal synchronization by selective visual attention. *Science* 291: 1560-1563.

6. Gray CM, Konig P, Engel AK, Singer W (1989) Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature* 338: 334-337.
7. Brunel N (2000) Dynamics of sparsely connected networks of excitatory and inhibitory spiking neurons. *J Comput Neurosci* 8: 183-208.
8. Borgers C, Kopell N (2003) Synchronization in networks of excitatory and inhibitory neurons with sparse, random connectivity. *Neural Comput* 15: 509-538.
9. Bathellier B, Lagier S, Faure P, Lledo PM (2006) Circuit properties generating gamma oscillations in a network model of the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 95: 2678-2691.
10. Wang XJ, Buzsaki G (1996) Gamma oscillation by synaptic inhibition in a hippocampal interneuronal network model. *J Neurosci* 16: 6402-6413.
11. Galan RF, Fourcaud-Trocme N, Ermentrout GB, Urban NN (2006) Correlation-induced synchronization of oscillations in olfactory bulb neurons. *J Neurosci* 26: 3646-3655.
12. Buonviso N, Amat C, Litaudon P, Roux S, Royet JP, et al. (2003) Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *Eur J Neurosci* 17: 1811-1819.
13. Cenier T, Amat C, Litaudon P, Garcia S, Lafaye de Micheaux P, et al. (2008) Odor vapor pressure and quality modulate local field potential oscillatory patterns in the olfactory bulb of the anesthetized rat. *Eur J Neurosci* 27: 1432-1440.
14. Kay LM (2003) Two species of gamma oscillations in the olfactory bulb: dependence on behavioral state and synaptic interactions. *J Integr Neurosci* 2: 31-44.
15. Ravel N, Chabaud P, Martin C, Gaveau V, Hugues E, et al. (2003) Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60-90 Hz) and beta (15-40 Hz) bands in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 17: 350-358.
16. Wesson DW, Donahou TN, Johnson MO, Wachowiak M (2008) Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem Senses* 33: 581-596.
17. Wehr M, Laurent G (1996) Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature* 384: 162-166.
18. Friedrich RW, Habermann CJ, Laurent G (2004) Multiplexing using synchrony in the zebrafish olfactory bulb. *Nat Neurosci* 7: 862-871.
19. Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N (2004) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *J Neurosci* 24: 389-397.
20. Beshel J, Kopell N, Kay LM (2007) Olfactory bulb gamma oscillations are enhanced with task demands. *J Neurosci* 27: 8358-8365.
21. Neville KR, Haberly LB (2003) Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 90: 3921-3930.
22. Bressler SL (1987) Relation of olfactory bulb and cortex. I. Spatial variation of bulbocortical interdependence. *Brain Res* 409: 285-293.
23. Eeckman FH, Freeman WJ (1990) Correlations between unit firing and EEG in the rat olfactory system. *Brain Res* 528: 238-244.
24. Lagier S, Carleton A, Lledo PM (2004) Interplay between local GABAergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 24: 4382-4392.
25. Laurent G, Wehr M, Davidowitz H (1996) Temporal representations of odors in an olfactory network. *J Neurosci* 16: 3837-3847.
26. Nikonov AA, Parker JM, Caprio J (2002) Odorant-induced olfactory receptor neural oscillations and their modulation of olfactory bulbar responses in the channel catfish. *J Neurosci* 22: 2352-2362.
27. Kashiwadani H, Sasaki YF, Uchida N, Mori K (1999) Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular receptive ranges in the rabbit olfactory bulb. *J Neurophysiol* 82: 1786-1792.

28. Chaput MA, Buonviso N, Berthommier F (1992) Temporal Patterns in Spontaneous and Odour-evoked Mitral Cell Discharges Recorded in Anaesthetized Freely Breathing Animals. *Eur J Neurosci* 4: 813-822.
29. Lestienne R, Tuckwell HC, Chalansonnet M, Chaput M (1999) Repeating triplets of spikes and oscillations in the mitral cell discharges of freely breathing rats. *Eur J Neurosci* 11: 3185-3193.
30. Buonviso N, Chaput MA, Berthommier F (1992) Temporal pattern analyses in pairs of neighboring mitral cells. *J Neurophysiol* 68: 417-424.
31. Rhode WS, Greenberg S (1994) Encoding of amplitude modulation in the cochlear nucleus of the cat. *J Neurophysiol* 71: 1797-1825.
32. Pikovsky A, Rosenblum M, Kurths J (2001) *Synchronization: A Universal Concept in Nonlinear Sciences*, Cambridge, MA, Cambridge University Press
33. Markowitz DA, Collman F, Brody CD, Hopfield JJ, Tank DW (2008) Rate-specific synchrony: using noisy oscillations to detect equally active neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8422-8427.
34. Martin C, Gervais R, Messaoudi B, Ravel N (2006) Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity. *Eur J Neurosci* 23: 1801-1810.
35. Gire DH, Schoppa NE (2008) Long-term enhancement of synchronized oscillations by adrenergic receptor activation in the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 99: 2021-2025.
36. Cenier, T, David FO, Litaudon P, Garcia S., Amat C, Buonviso N. (2009) Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb. *Eur J Neurosci*. 10.1111/j.1460-9568.2009.06651.x. epub 2 mar 2009 (*inPress*)
37. Desmaisons D, Vincent JD, Lledo PM (1999) Control of action potential timing by intrinsic subthreshold oscillations in olfactory bulb output neurons. *J Neurosci* 19: 10727-10737.
38. Balu R, Larimer P, Strowbridge BW (2004) Phasic stimuli evoke precisely timed spikes in intermittently discharging mitral cells. *J Neurophysiol* 92: 743-753.
39. Rubin DB, Cleland TA (2006) Dynamical mechanisms of odor processing in olfactory bulb mitral cells. *J Neurophysiol* 96: 555-568.
40. Kozlov AS, Angulo MC, Audinat E, Charpak S (2006) Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 10058-10063.
41. Isaacson JS (1999) Glutamate spillover mediates excitatory transmission in the rat olfactory bulb. *Neuron* 23: 377-384.
42. Salin PA, Lledo PM, Vincent JD, Charpak S (2001) Dendritic glutamate autoreceptors modulate signal processing in rat mitral cells. *J Neurophysiol* 85: 1275-1282.
43. Parra L, Bikson M (2004) Model of the effect of extracellular fields on spike time coherence. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 6: 4584-4587.
44. Radman T, Su Y, An JH, Parra LC, Bikson M (2007) Spike timing amplifies the effect of electric fields on neurons: implications for endogenous field effects. *J Neurosci* 27: 3030-3036.
45. Lledo PM, Lagier S (2006) Adjusting neurophysiological computations in the adult olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol* 17: 443-453.
46. Izhikevich E (2006) *Dynamical Systems in Neuroscience: the Geometry of Excitability and Bursting*; Press TM, editor.
47. Shimokawa T, Pakdaman K, Sato S (1999) Mean discharge frequency locking in the response of a noisy neuron model to subthreshold periodic stimulation. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 60: R33-36.
48. Brumberg JC, Gutkin BS (2007) Cortical pyramidal cells as non-linear oscillators: experiment and spike-generation theory. *Brain Res* 1171: 122-137.
49. Yokoi M, Mori K, Nakanishi S (1995) Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3371-3375.

50. Spors H, Wachowiak M, Cohen LB, Friedrich RW (2006) Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. *J Neurosci* 26: 1247-1259.
51. Brown E, Moehlis J, Holmes P (2004) On the phase reduction and response dynamics of neural oscillator populations. *Neural Comput* 16: 673-715.
52. Gutkin BS, Ermentrout GB, Reyes AD (2005) Phase-response curves give the responses of neurons to transient inputs. *J Neurophysiol* 94: 1623-1635.
53. Schaus MJ, Moehlis J. On the Response of Neurons to Sinusoidal Current Stimuli: Phase Response Curves and Phase-Locking; 2006 Dec. 13-15th 2006; San Diego. pp. 2376-2381.
54. Galan RF, Ermentrout GB, Urban NN (2005) Efficient estimation of phase-resetting curves in real neurons and its significance for neural-network modeling. *Phys Rev Lett* 94: 158101.
55. Kuramoto Y. Self-entrainment of a population of coupled non-linear oscillators. . In: (Springer B, editor; 1975; Berlin. Ed. H. Araki pp. pp.420-422.
56. Schoppa NE, Westbrook GL (2001) Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. *Neuron* 31: 639-651.
57. Urban NN, Sakmann B (2002) Reciprocal intraglomerular excitation and intra- and interglomerular lateral inhibition between mouse olfactory bulb mitral cells. *J Physiol* 542: 355-367.
58. Friedman D, Strowbridge BW (2003) Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 89: 2601-2610.
59. Christie JM, Bark C, Hormuzdi SG, Helbig I, Monyer H, et al. (2005) Connexin36 mediates spike synchrony in olfactory bulb glomeruli. *Neuron* 46: 761-772.
60. Egger V, Svoboda K, Mainen ZF (2003) Mechanisms of lateral inhibition in the olfactory bulb: efficiency and modulation of spike-evoked calcium influx into granule cells. *J Neurosci* 23: 7551-7558.
61. Egger V, Svoboda K, Mainen ZF (2005) Dendrodendritic synaptic signals in olfactory bulb granule cells: local spine boost and global low-threshold spike. *J Neurosci* 25: 3521-3530.
62. Schoppa NE (2006) Synchronization of olfactory bulb mitral cells by precisely timed inhibitory inputs. *Neuron* 49: 271-283.
63. Schoppa NE (2006) AMPA/kainate receptors drive rapid output and precise synchrony in olfactory bulb granule cells. *J Neurosci* 26: 12996-13006.
64. Zelles T, Boyd JD, Hardy AB, Delaney KR (2006) Branch-specific Ca²⁺ influx from Na⁺-dependent dendritic spikes in olfactory granule cells. *J Neurosci* 26: 30-40.
65. Fourcaud-Trocme N, Galan RF, Urban NN. Ionic current basis of the typeII dynamics in olfactory bulb mitral cells; 2006 October; Pontamousson.
66. Kapoor V, Urban NN (2006) Glomerulus-specific, long-latency activity in the olfactory bulb granule cell network. *J Neurosci* 26: 11709-11719.
67. Isaacson JS, Strowbridge BW (1998) Olfactory reciprocal synapses: dendritic signaling in the CNS. *Neuron* 20: 749-761.
68. Schoppa NE, Kinzie JM, Sahara Y, Segerson TP, Westbrook GL (1998) Dendrodendritic inhibition in the olfactory bulb is driven by NMDA receptors. *J Neurosci* 18: 6790-6802.
69. Schoppa NE, Westbrook GL (1999) Regulation of synaptic timing in the olfactory bulb by an A-type potassium current. *Nat Neurosci* 2: 1106-1113.
70. Destexhe A, Rudolph M, Pare D (2003) The high-conductance state of neocortical neurons in vivo. *Nat Rev Neurosci* 4: 739-751.
71. Chaput MA (2000) EOG responses in anesthetized freely breathing rats. *Chem Senses* 25: 695-701.
72. Margrie TW, Schaefer AT (2003) Theta oscillation coupled spike latencies yield computational vigour in a mammalian sensory system. *J Physiol* 546: 363-374.

73. Zou Z, Li F, Buck LB (2005) Odor maps in the olfactory cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 7724-7729.
74. Bruno RM, Sakmann B (2006) Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science* 312: 1622-1627.
75. Tiesinga PH, Jose JV (2000) Robust gamma oscillations in networks of inhibitory hippocampal interneurons. *Network* 11: 1-23.
76. Zou Z, Buck LB (2006) Combinatorial effects of odorant mixes in olfactory cortex. *Science* 311: 1477-1481.
77. Franks KM, Isaacson JS (2006) Strong single-fiber sensory inputs to olfactory cortex: implications for olfactory coding. *Neuron* 49: 357-363.
78. Perez-Orive J, Mazor O, Turner GC, Cassenaer S, Wilson RI, et al. (2002) Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science* 297: 359-365.
79. Perez-Orive J, Bazhenov M, Laurent G (2004) Intrinsic and circuit properties favor coincidence detection for decoding oscillatory input. *J Neurosci* 24: 6037-6047.
80. Roux SG, Garcia S, Bertrand B, Cenier T, Vigouroux M, et al. (2006) Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. *J Neurosci Methods* 152: 173-178.
81. Roux SG, Cenier T, Garcia S, Litaudon P, Buonviso N (2007) A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal. *J Neurosci Methods* 160: 135-143.
82. Kronland-Martinet R, Morlet J, Grossmann A (1987) Analysis of sound patterns through wavelet transforms pp.273-302. *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence*
83. Fisher NI (1993) *Statistical Analysis of Circular Data*; Cambridge, editor. New York: Cambridge University Press.
84. Dayan P, L. F, Abbott (2001) *Theoretical Neuroscience*. Cambridge, MA: MIT Press.
85. Wang XJ (1993) Ionic basis for intrinsic 40 Hz neuronal oscillations. *Neuroreport* 5: 221-224.
86. Bhalla US, Bower JM (1993) Exploring parameter space in detailed single neuron models: simulations of the mitral and granule cells of the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 69: 1948-1965.
87. Wang XY, McKenzie JS, Kemm RE (1996) Whole-cell K⁺ currents in identified olfactory bulb output neurones of rats. *J Physiol* 490 (Pt 1): 63-77.
88. Cang J, Isaacson JS (2003) In vivo whole-cell recording of odor-evoked synaptic transmission in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 23: 4108-4116.
89. Davison AP, Feng J, Brown D (2000) A reduced compartmental model of the mitral cell for use in network models of the olfactory bulb. *Brain Res Bull* 51: 393-399.
90. Migliore M, Hines ML, Shepherd GM (2005) The role of distal dendritic gap junctions in synchronization of mitral cell axonal output. *J Comput Neurosci* 18: 151-161.
91. Lowe G (2002) Inhibition of backpropagating action potentials in mitral cell secondary dendrites. *J Neurophysiol* 88: 64-85.
92. Isaacson JS (2001) Mechanisms governing dendritic gamma-aminobutyric acid (GABA) release in the rat olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 337-342.
93. Davison AP, Feng J, Brown D (2003) Dendrodendritic inhibition and simulated odor responses in a detailed olfactory bulb network model. *J Neurophysiol* 90: 1921-1935.
94. Xiong W, Chen WR (2002) Dynamic gating of spike propagation in the mitral cell lateral dendrites. *Neuron* 34: 115-126.
95. Migliore M, Shepherd GM (2007) Dendritic action potentials connect distributed dendrodendritic microcircuits. *J Comput Neurosci*.

Figure legends

Figure 1: Unit activities and LFP gamma oscillation frequencies had the same mean but very different variability.

A) Raw signal recorded in the MC layer during odorant stimulation. Vertical continuous lines: I/E transitions; vertical dashed lines: E/I transitions. B) Time frequency representation extracted from the raw signal and based upon a wavelet transformation. The signal energy at each time-frequency point is in a colorscale. C) *Top*) Distribution of LFP gamma-burst mean frequencies with a normal function fit, which is shown as a black trace. *Bottom*) Distribution of LFP cycle instantaneous frequency, which is defined as the inverse of the period between two max of the oscillation, and which is normalized to the average frequency of the gamma burst to which the cycle belongs. D) Instantaneous frequencies along one respiratory cycle (six colors for six cells). + are spike positions for which gamma LFP oscillations are present. E) Interspike interval distribution (ISI) for spike trains occurring during gamma oscillations (bin 0.05 cycle, black line, gamma function distribution with the same mean ISI as the experimentally found (see methods)). Contour histogram is the distribution of the mean ISIs that was calculated for each spike train. All units are given in “cycle”.

Figure 2: Rate dependence of spike phase distribution during gamma oscillation.

A) Spike phase distribution (phase bin = 0.02 cycle) for all spikes during gamma oscillation (black line). The coupling strength was weak and statistically significant [mean = 0.472, average length, $r = 0.25$, circular deviation = 1.67; $p < 0.01$, Rayleigh test]. B) Spike phase distribution according to the mean spike rate (measured in Spike per Cycle (SpC)), (see y-label). (* indicate $p < 0.01$ for a non-homogeneous distribution). The phase means were 0.480, 0.471, 0.486, 0.409, phase average lengths were 0.29, 0.31, 0.28, 0.11 for the respective phase distributions. C) Examples of spike trains showing regularity of spike phases at a low (upper panel) or high (lower panel) firing rate; *Black trace*, raw signal; *black circles*, spikes during gamma LFP oscillation; *grey sinusoid*, extracted LFP oscillation; *grey lines*, LFP phases from 0 to 1; *black ticks*, spike time and phase positions.

Figure 3: Types of phase-locking.

A) Classification principles. Spike phases (x-axis) are represented by grey ticks along the successive gamma cycles (y-axis) of a LFP burst. If the spike train has a regular number of spike at each cycle (here, 1 spike at each cycle, see Methods for details), and if the phase jitter is small enough (< 0.5) (left panel) in comparison to the mean phase (*black boxes*), it is classified as a phase-locked pattern (here, a 1:1 pattern). Otherwise (right panel), the spike train is classified as residual. B) Six examples of phase-locked spike trains. Along the top of each plot is indicated the type of pattern (q:p types--3:1, 2:1, 1:1, 2:3, 1:2, 1:3--where q:p indicates p spikes during q cycles) and its phase jitter. Phase-locked patterns account for 31% of all spike trains that last during the time of at least three LFP gamma cycles. C) Distributions of experimentally found (grey) and randomly generated (black contours) phase-locked pattern types. The majority of the patterns were 1:1 in both distributions. D) Distribution of relative distances (see Methods) from spike train phases to the closest pattern for the experimentally found (grey) and randomly generated (black contours) spike trains. Dashed line is the strict distance limit (0.33) under which the spike train can be considered for phase locking. Note the good agreement between experimentally found and randomly generated distance distributions. E) Distribution of phase jitter for experimentally found (grey) and randomly generated (black contours) spike trains for the respective phase-locked

pattern type. The dashed line is the limit (0.5) under which the spike train is considered phase locked. Note that the area of experimentally found distributions under the limit was often larger than those of the randomly generated distributions, especially for the 1:1 patterns (* indicate significant global statistical differences between both distributions, Kolmogorov Smirnov test, $p < 0.05$).

Figure 4: Firing rate control during gamma episodes.

A) Instantaneous frequencies ($1/ISI$) were plotted from 200 ms before the gamma burst to 300 ms after. $t = 0$ at the beginning of the gamma burst, which is shown as a grey zone and by the symbolic oscillation atop of each graph. For each pattern type (A1-6), black dots are instantaneous frequencies (y-axes) as a function of their time position (x-axes) relative to the beginning of the LFP gamma burst. The mean instantaneous frequency (*bold line*) \pm its standard deviation (*thin lines*) is estimated by averaging instantaneous frequencies over time bins of 50 ms. B) Mean firing rate averaged over 50-ms time bins (B1) and its standard deviation (B2) for spike trains expressing one type of phase-locked pattern (see legend for symbol-pattern correspondence). Compared to A, cells that do not fire during a bin are also taken into account in the average. B1 shows that the firing rate before and after the gamma burst was correlated with the firing rate during the gamma burst for each pattern. B2 clearly shows that the firing rate standard deviation decreases for all patterns immediately after the gamma oscillation begins.

Figure 5: Oscillatory inhibition at 60 Hz controls MC model firing rate and phase jitter.

A1) The firing rate (y-axis) of the MC model is plotted (red) in spikes per cycle (SpC) for a 60 Hz oscillation as a function of the excitatory conductance g_E (x-axis), while the cell is submitted to a constant inhibitory conductance $g_I = 20 \text{ S/m}^2$. The firing rate was measured for two inhibitory oscillatory conductances (g_{Io}): 10% (blue) and 30% (green). Plateaus appear around 0.5 SpC (a), 1 SpC (b), 1.5 SpC (c), 2 SpC (d) and 3 SpC (e) (see arrows). A2): Same as in A1, but under noisy conditions. The main plateaus remained after the addition of noise. B) Examples of spike patterns along four oscillation cycles plotted using the same conventions as in Fig. 3. They correspond to different g_E positions along the curves drawn in A1, i.e., without noise (see small capital letters for correspondence). C) Phase jitter map according to g_E (x-axis) and g_{Io} (y-axis). C1) Without noise, null-jitter zones (black zones) correspond to tongues 2:1, 1:1, 2:3, 1:2, and 1:3 (indicated on the map). Colored zones represent the regime of non-locked spike trains with jitter > 0.05 (see colored bar). Tongue width increases with g_{Io} . Tongues start at $g_{Io} = 0$ when the unforced neuron frequency is 1, 1.5, 2, and 3 SpC (see the frequency-x-axis below, which corresponds to the unforced frequency at a given excitatory input). C2) Noisy conditions. Noise tended to degrade the phase-locking, but the tongue structures persisted.

Figure 6: Model phase distribution and comparison with experimental phases in phase locked patterns.

A1) Model spike phase (y-axis) distribution is plotted like a phase map (see grey scale bar) as a function of g_E (x-axis). For a 10% oscillatory inhibition ($g_{Io} = 2 \text{ S/m}^2$, $g_I = 20 \text{ S/m}^2$), the MC model exhibited clear preferential phases (dark spots; arrows indicate tongue q:p). A2)

Increasing the inhibitory amplitude to 30% ($g_{I_0} = 6 \text{ S/m}^2$) value for g_{I_0} led to an increased g_E band (see the horizontal double arrow), for which the phases were locked. A3) Noisy conditions, which were the same levels of inhibition as in (A2), caused the phases to scatter around the tongue phases. B) Comparison of model (*left panels*) and experimental (*right panels*) phase distribution for spike train classified as phase locked patterns (one row for each type of pattern).

Figure 7: Influence of synaptic input parameters on MC model locking.

A) Tongue 1:1 limits. The edges of tongue 1:1 are shown for various levels of global inhibition g_I (6, 20, 100 S/m^2) in the absence of noise. Values of g_E corresponding to tongue edges are shown relative to $g_{E, \text{threshold } 1:1}$, which corresponds to the tongue start at $g_{I_0} = 0$ and depends on g_I . B) Tonic inhibition effect. Representation of tongue 1:1 width for $g_{I_0} = 2 \text{ S/m}^2$. The g_E -band (full black line in conductance units, left y-axis) and the f-band (full grey line in frequency units, right y-axis) are shown as a function of the global inhibition level g_I . The f-band is the range of unforced frequency that can be locked by the oscillation. Dashed lines correspond to noisy conditions and $g_{I_0} = 1 \text{ S/m}^2$. C) Tongue map. Phase-locked zones are shown for the tongues 2:1 (dark grey), 1:1 (black), and 1:2 (light grey) in the plane that is represented by the intrinsic MC frequency, which is determined when $g_{I_0} = 0$ (x-axis) and the frequency of the oscillation (f_{osc}) (y-axis). For these results, $g_I = 20 \text{ S/m}^2$, and $g_{I_0} = 1 \text{ S/m}^2$. The dashed line is $y = x$. D) Oscillation frequency preference for locking. The 1:1 tongue f-band width [indicated by arrows in (C)] is plotted as a function of f_{osc} using a *bold black-line* with the parameters in (C). Various conditions are tested, such as the amplitude of g_{I_0} , g_I and g_{I_s} (see details in the figure). MC entrainment was always maximal between 50 and 70 Hz for any value of g_I , g_{I_0} , and noise.

Figure 8: MC-intrinsic properties control the range maximal entrainment.

The width of the intrinsic frequency range for which the MC model is locked (i.e., the f-band width) is plotted as a function of f_{osc} (as in Fig. 7D) for different values of the slow K channel activation time constant. $\tau_{mK_s} = 10 \text{ ms}$ was the default in previous figures, $\tau_{mK_s} = 7 \text{ ms}$ (thin line) indicates a peak drift to faster frequencies, and $\tau_{mK_s} = 13 \text{ ms}$ (bold line) shows peak drift toward lower frequencies.

Figure 9: Method for detection of phase-locked patterns.

Step by step description using an example:

(1) A spike train taken from experimental recordings is represented with its phases (x-axis, top left) along the successive gamma cycles (y-axis). This train was characterized by the number of spikes in each cycle (left matrix), and we allocated different indexes for spikes in the same cycle in the order in which they appeared in the cycle (right matrix).

(2) Independently, a pattern sequence generator created all phase trains that have the same cycle length as the experimental one. In this case, the length was four. Three examples of all these generated pattern sequences are shown as column vectors (theoretical pattern column), each of which is affiliated with a particular pattern (e.g. 1:1, 1:2, 1:3). The **absolute distance** between experimental spike train and theoretical pattern was measured by summing the result of the equality test over all of the cycles of the train. In terms of spike number, if the spike

numbers are identical, then the test result is 0, otherwise it is 1. The **relative distance** was obtained by dividing the absolute distance by the number of cycles that were covered by the train. At this step, we eliminated the pattern sequences with a relative distance ≥ 0.33 (e.g. the last line pattern 1:3 example).

(3) All of the position possibilities were then considered for the spike (index) position of the experimental train in the selected patterns (grid). Single or multiple correspondences are shown for each selected pattern.

(4) Based on these positions in the hypothesized pattern, we empirically estimated the mean phase of the pattern from spike positions. For example, in the first plot (top right), the black boxes are the mean phase of spike index 1. A jitter was calculated based on the distance of each spike to the mean phase (distances to the mean phase are marked with arrows in the second plot). This jitter is indicated in the last column.

We kept only the pattern with the smallest jitter and considered the original spike train as phase-locked only if this jitter fulfilled the stringent condition ($\sigma < 0.5$). In this example, the spike train is considered to be a phase-locked 1:1 pattern.

(5) We show here some examples of spike trains that were not classified as phase-locked patterns because of their too large distance or too large jitter.

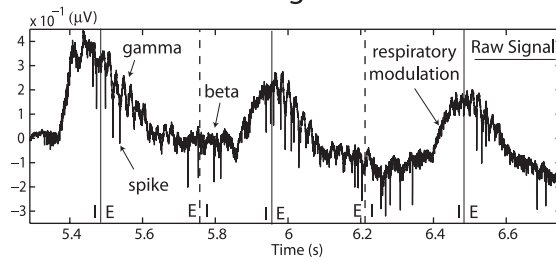
Figure 10: Data set information relative to cell and odors.

A) Distribution of the number of spike trains per cell. B) Distribution of the number of spike trains per odor. C) Distribution of the number of detected patterns per cell. D) Distribution of the number of detected patterns per odor. In panels A-D, all indexes are based on a decreasing number of trains or patterns per cell or odor. E) Cell contribution to pattern variety. The majority of cells do not fire patterns, and a minority is able to evoke more than one type of pattern. F) Correlation between odor and pattern formation. The distribution of a difference of probability is plotted. The difference is estimated for each cell as (1) the probability of finding the same pattern evoked by the same odor, minus, (2) the probability of finding the same pattern evoked by different odors.

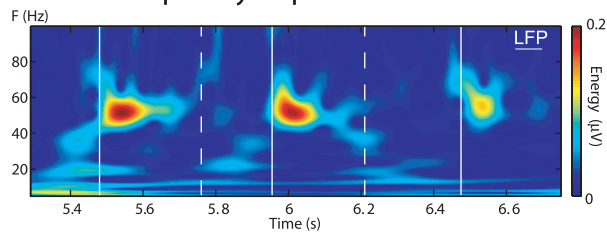
Figure 11: Methods for comparison of original and reduced MC model.

A) Voltage traces of the original 9-variable MC model (left) and the reduced 4-variable MC model (right) are similar in terms of spike timing and subthreshold regime for similar ranges of injected current (in A/m^2). B) Subthreshold oscillation frequency (dashed line) and spiking frequency (continuous line) are plotted as a function of the injected current for both 9-variable (grey) and 4-variable (black) models. C) Subthreshold resonance. Resonance frequency extracted from eigenvalues of the system at its resting potential for both 9-variable (grey) and 4-variable (black) models. D) Phase response curve estimated at 40Hz spiking frequency show that integration properties are similar while both model are spiking (See method for construction). E) Response to oscillatory input. The spike times (vertical ticks), the oscillatory conductance, and the voltage trace are plotted for the 4-variable without noise (left) and with noise (right)).

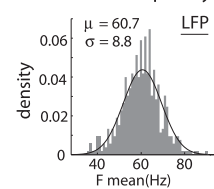
A Raw extracellular signal



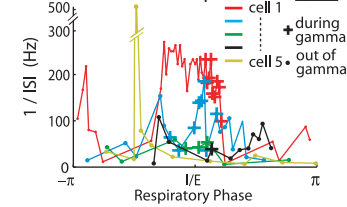
B Time-Frequency Representation



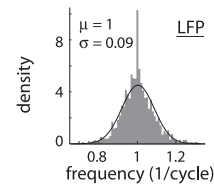
C LFP bursts frequency



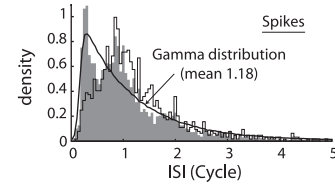
D Instantaneous frequencies



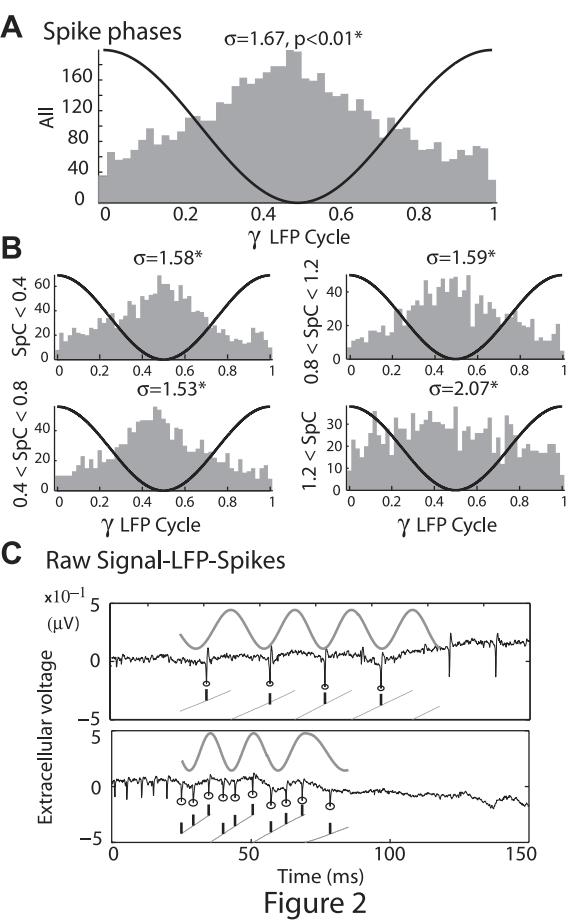
LFP instantaneous frequency

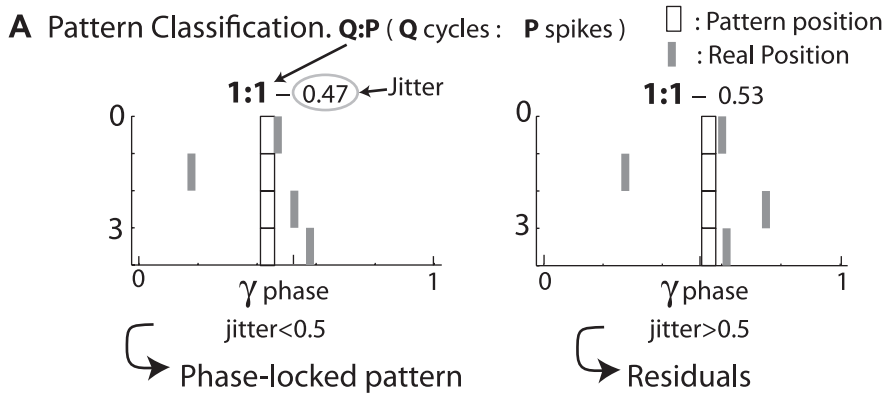


E ISI distribution

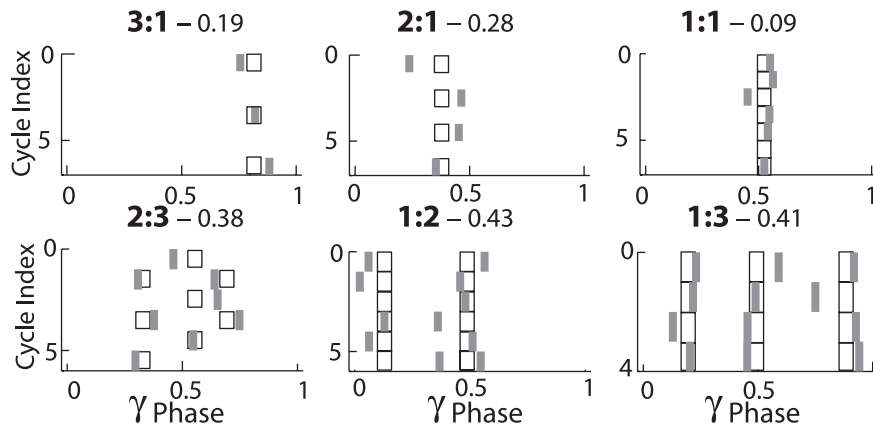


170
Figure 1

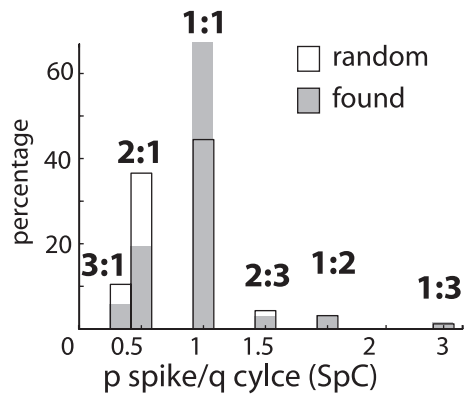




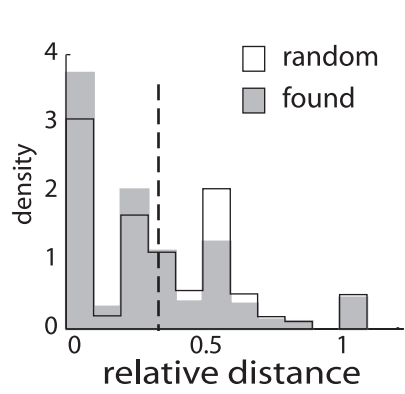
B Phase-locked pattern examples



C Pattern Distribution



D Distance distribution



E Jitter distribution

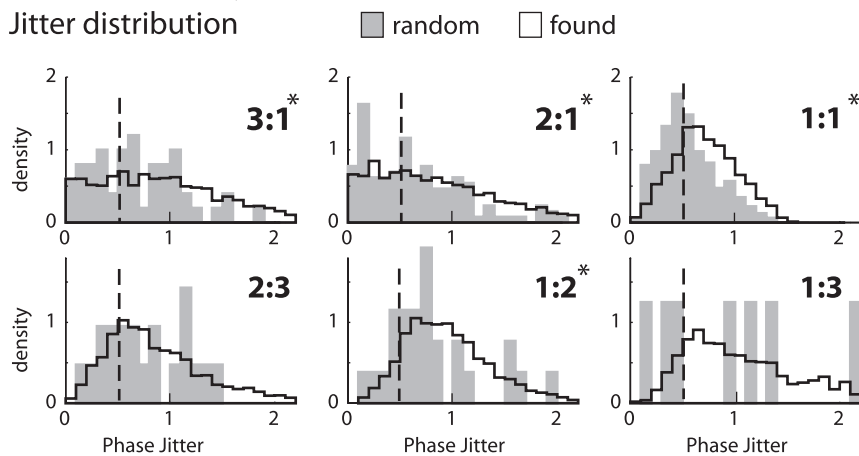
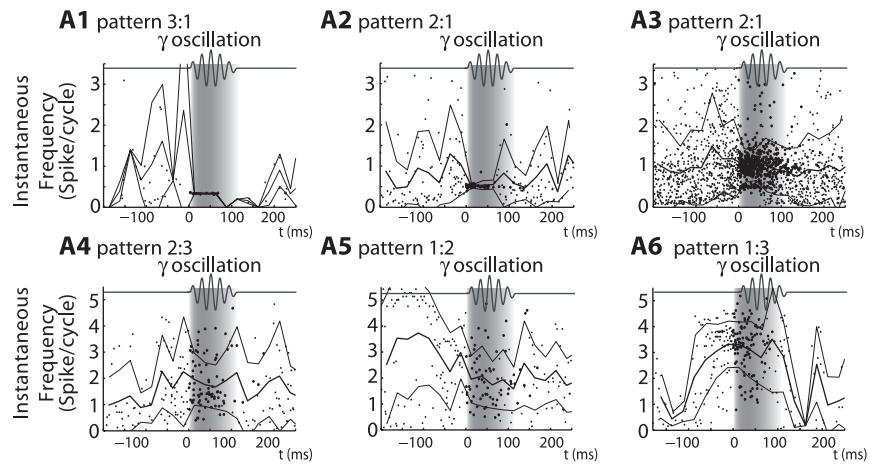


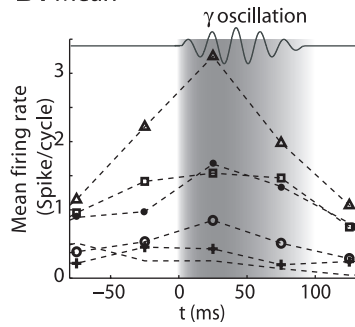
Figure 3

A Instantaneous frequency statistics

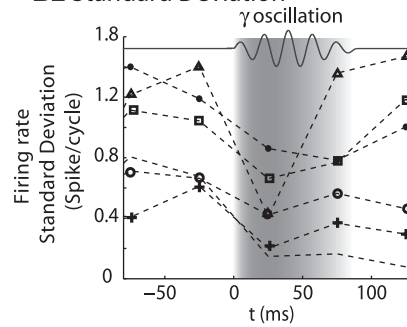


B Firing rate statistics

B1 Mean



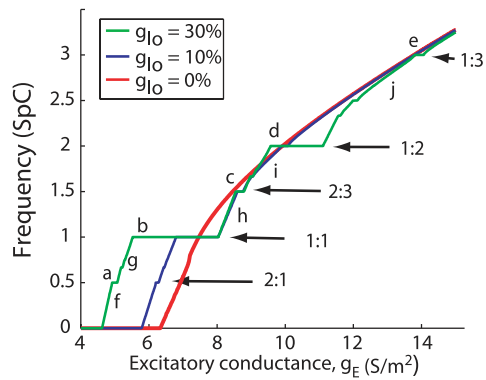
B2 Standard Deviation



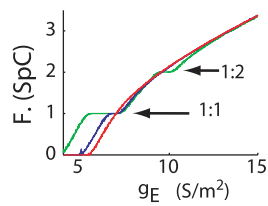
173

Figure 4

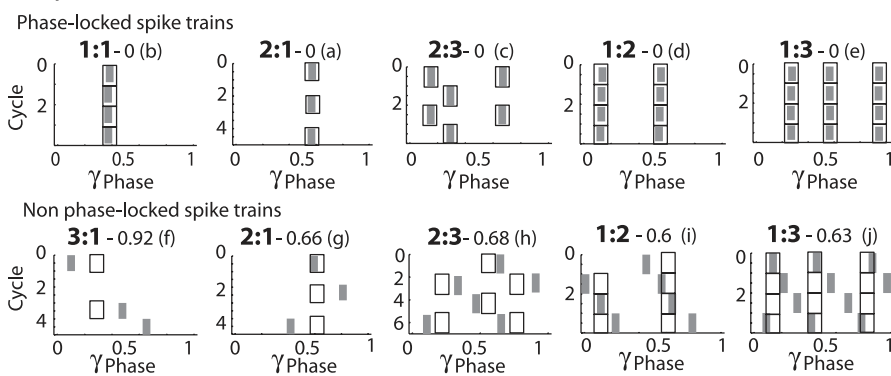
A1 Frequency control by the oscillation



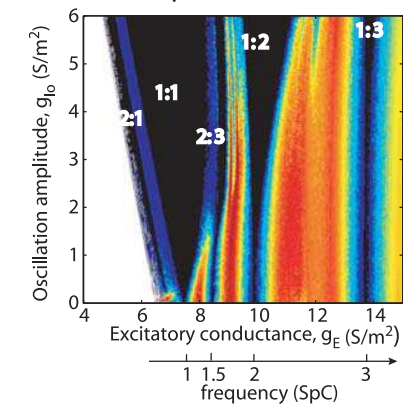
A2 With Noise



B Spike Patterns



C1 Jitter map



C2 Jitter map with noise

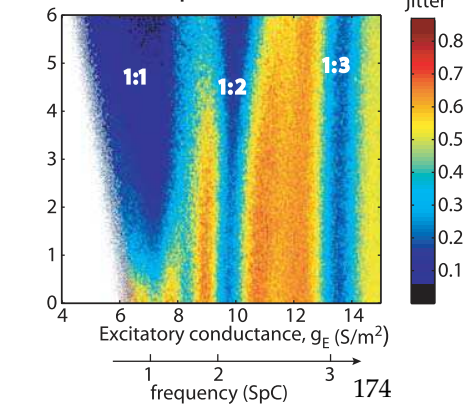


Figure 5

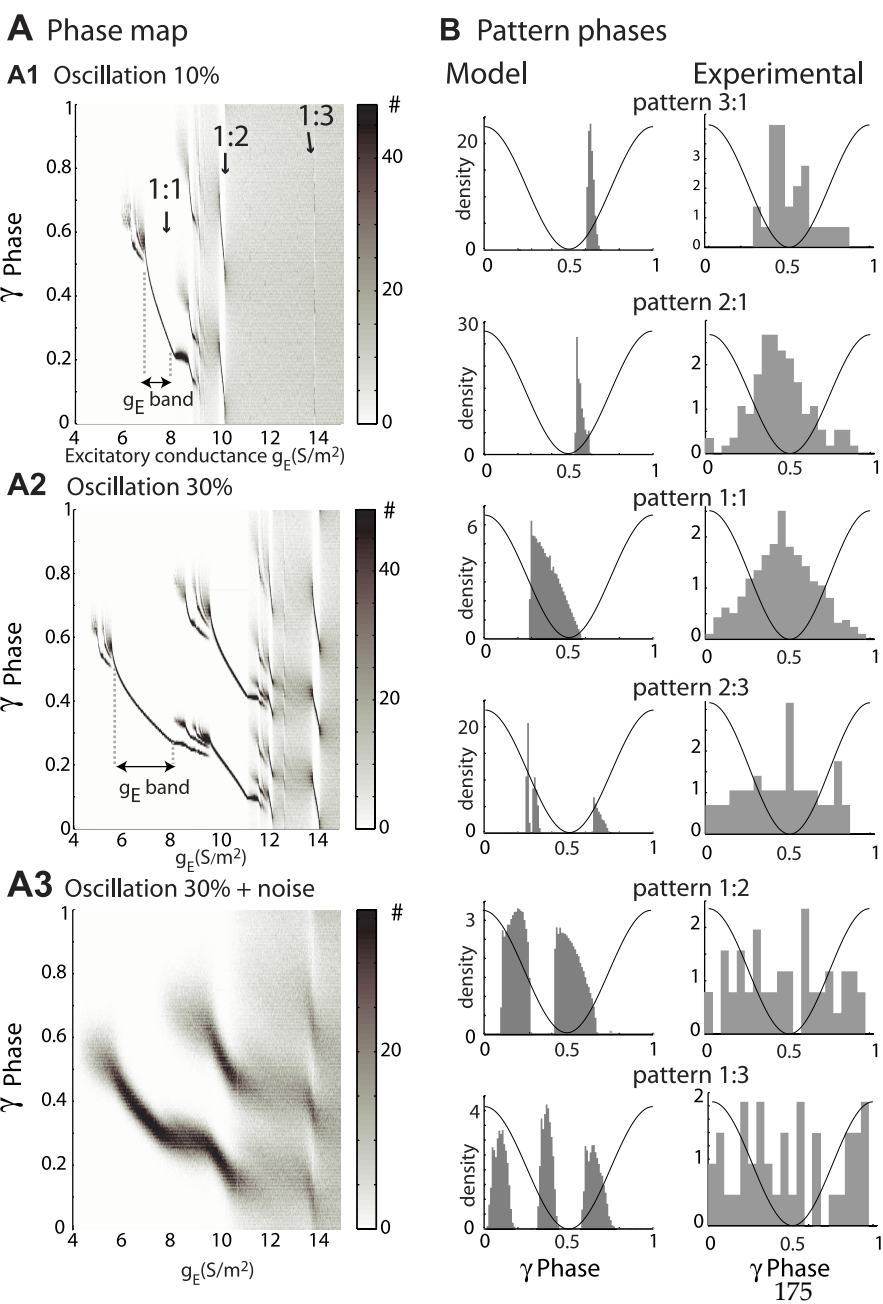


Figure 6

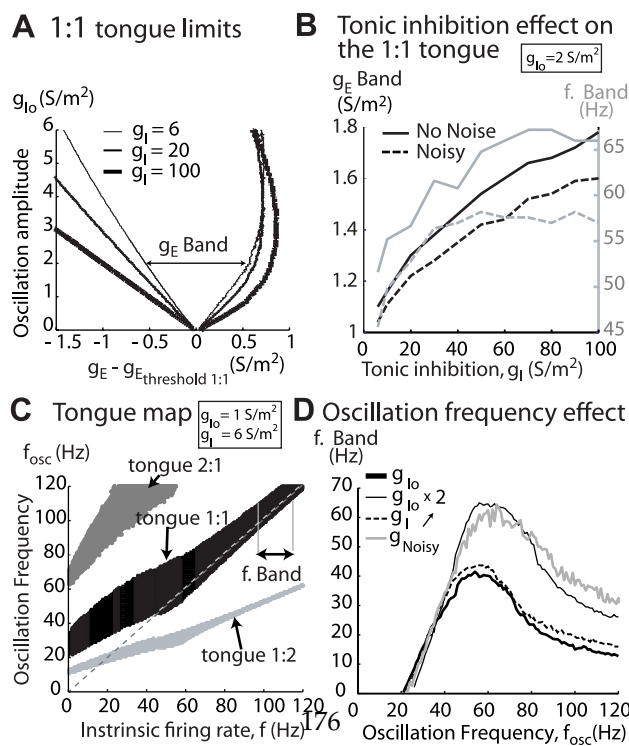


Figure 7

Neuron intrinsic property effect

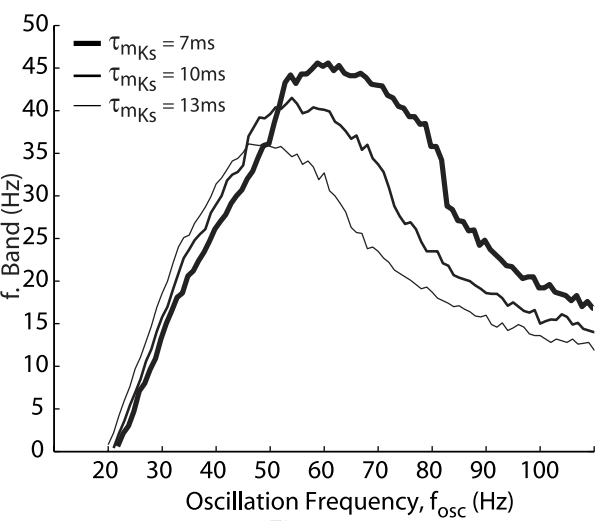
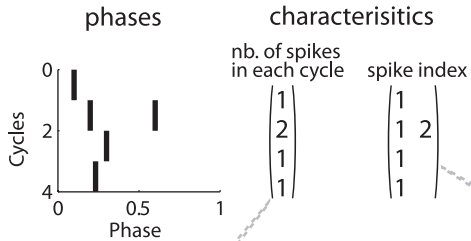


Figure 8

Methods

① Experimental Phase Trains

example:



③

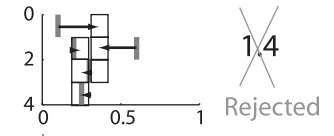
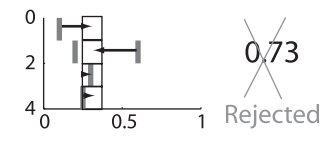
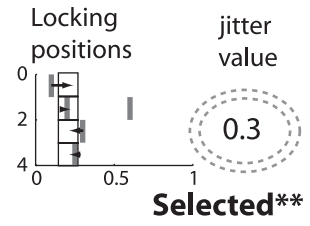
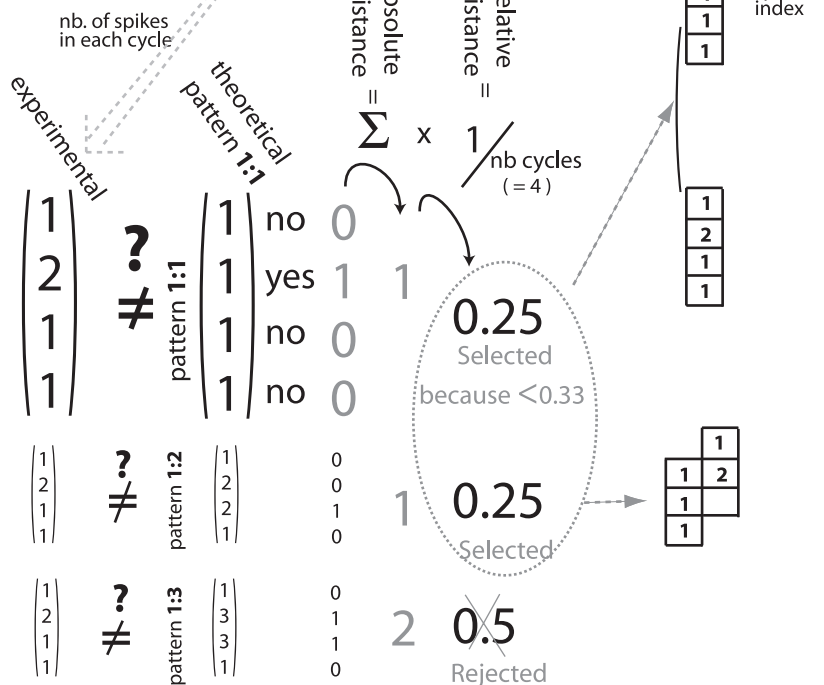
Pattern Matching with spike position

④

Pattern selection + Train classification based on jitter

② Pattern Matching with distance

examples:



* This pattern is selected as the closest matching pattern because the jitter is the minimum of all.

* The phase train is selected as a phase-locked pattern because the jitter is < 0.5

⑤ Examples of residual phase trains

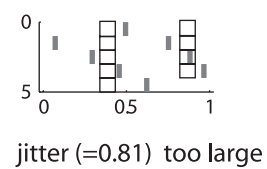
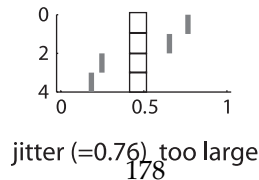
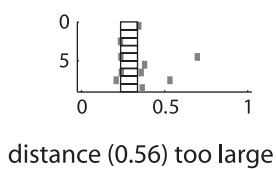


Figure 9

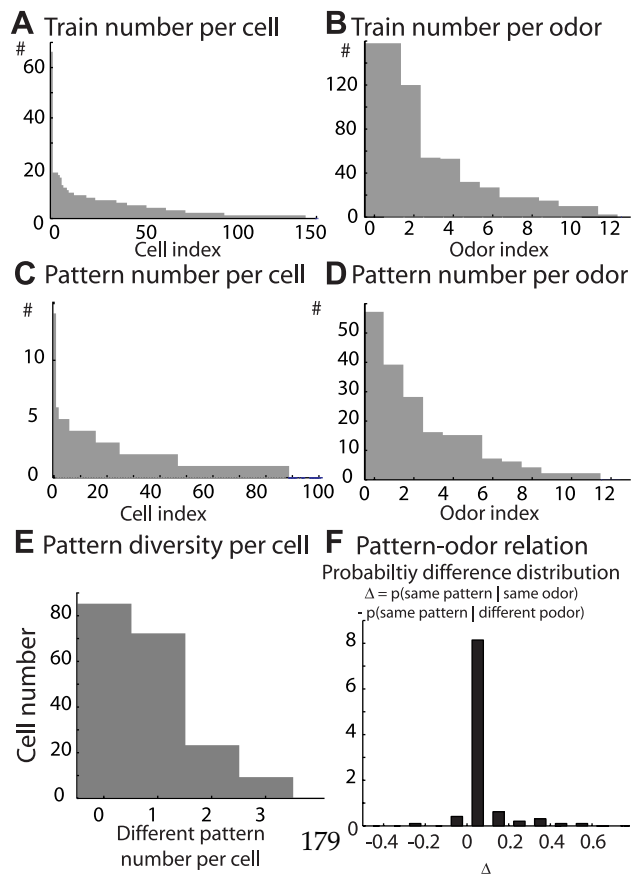


Figure 10

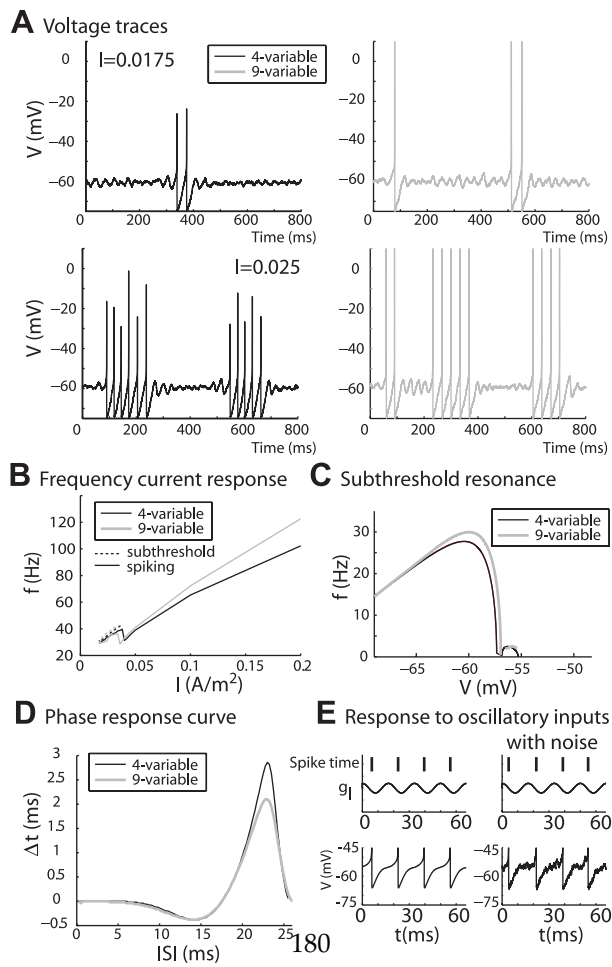


Figure 11

C Article d'encyclopédie

TEMPORAL CODING IN OLFACTORY SYSTEM.

Nathalie Buonviso, Tristan Cenier, François David.

Publié dans *Encyclopedia of Neuroscience*, Springer 2008.

Éditeurs : par MM. Binder, M.D. ; Hirokawa, N. ; Windhorst, U. ; Hirsch, M.C.

Temporal Coding

NATHALIE BUONVISO, TRISTAN CENIER,
FRANÇOIS DAVID

Neurosciences sensorielles, Comportement, Cognition
Université Claude Bernard Lyon 1 CNRS –
UMR5020 – INFL LYON, Lyon, France

Synonyms

Neuronal assemble; Synchronization; Firing patterns

Definition

Temporal coding in the olfactory system refers to the fact that some temporal components of the neuronal activity are used as cues for representation of odor quality and/or intensity.

Animals detect and discriminate a large variety of odor molecules in their environment. These molecules are recognized by odorant receptors (nearly 1,000 types of odorant receptors) located on sensory neurons in the olfactory epithelium. Sensory neurons that express a given odorant receptor are widely distributed within a specific zone of the olfactory epithelium. Each odorant can bind to multiple, but specific, odorant receptors so that the quality of an odorant is determined by the combination of a number of odorant receptors, each recognizing a specific molecular feature of the odorant molecule. Moreover, within the olfactory epithelium, odorant molecules migrate differentially according to their relative sorption properties and this migration can be enhanced or slowed down by inhalation rate or duration. Thus, the physico-chemical properties of odorant molecules determine a spatio-temporal representation of odors at the peripheral level. This representation is transferred to the glomeruli of the olfactory bulb (OB) by the axons of sensory neurons.

Anatomical, genetic and functional mapping studies indicate that each odorant is represented at the bulbar level by a spatial map of activated glomeruli. This glomerular organization is highly conserved across species, indicating that such spatial representation is crucial for information coding. However, while this spatial information is probably sufficient when an animal has to discriminate very different odors, it will

need a more precise representation for discrimination between very similar odors. Similarly, separation of odorants in a mixture needs more precision than a purely spatial representation. This precision might be provided by a mechanism that exploits the temporal aspects of neuronal activity. The temporal representation of a stimulus in neuronal structures has been evaluated through the observation of electrophysiological signals, mainly: (i) action potentials of individual cells and (ii) local field potentials (LFPs) of the network, representing the summated activity of a large neuronal population and their interactions.

Characteristics

What is “time” for olfactory coding? For about two decades, the theory of coding in the olfactory system has evolved according to two main ideas: (i) Information about an odor is carried by patterns of activity across a large population of neurons in the olfactory system, (ii) the absolute time of spikes is not the relevant information in **▶odor coding**; rather, the time has to be considered as relative to a particular clock or time basis. Olfactory information may be represented at various timescales: a slow timescale, depending on odor sampling processes (>100ms), and a faster one imposed by the network oscillatory activity (on the order of 10ms). Whatever the time basis, the coding principle consists in the transfer of reliable information including both odor intensity and odor quality.

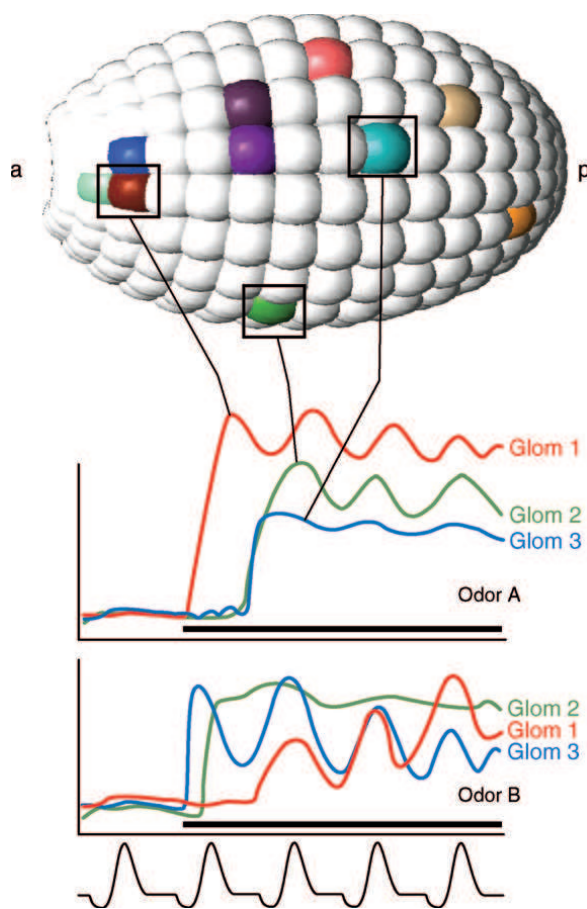
A Slow Time Scale Related to Odor Sampling

Because breathing results in periodic sampling of the olfactory environment in mammals, the respiratory cycle represents a naturally fitted temporal frame. The respiratory frequency, often named theta frequency, may vary from 1–2 Hz in anaesthetized animal to 8–12 Hz in the sniffing bouts of behaving rats. At the moment, there is no direct evidence that respiratory dynamics has a significant functional role in temporal coding; however, it is highly suggested by the fact that temporal coupling between olfactory and respiratory signals depends on chemical features of the odorants. Such coupling appears at multiple levels: receptor neuron input to the OB, OB network activity, OB output neuron activity and cortical cell activity.

At the Peripheral Level

Temporal dynamics of receptor neuron input to the OB can be visualized by calcium imaging methods [1]. Such an activity is oscillatory at the glomerular level and locked to the respiratory cycle. These odor-evoked ►glomerular oscillations differ in amplitude, latency and rise time in an odorant-specific manner (see Fig. 1).

Moreover, the odor-evoked response of each glomerulus is differentially modulated by sniffing parameters such as frequency. When odor concentration increases, response latencies are reduced, response amplitudes are increased, new glomeruli are recruited, but the temporal sequence of glomerular activation is



Temporal Coding. Figure 1 Temporal patterns of glomerular activation. *Top*: schematic representation of the glomerular layer of the olfactory bulb *a*: anterior, *p*: posterior. *Middle*: Representation of glomerular response intensity for three glomeruli: y-axes indicate the level of activation of the glomeruli (in arbitrary unit) in response to two odors A and B (horizontal bars indicate odor stimulation). *Bottom*: respiratory monitoring, negative deflection: inspiration; positive deflection: expiration. The amplitude, latency and rise time of activation vary across glomeruli and across odors. The fluctuation in the level of activation of the glomeruli is closely related to the respiratory phase. The temporal sequence of activated glomeruli differs between odors.

maintained. Thus, each odor is represented by a specific glomerular activation sequence, both within a sniff and across consecutive sniffs, which contains a concentration-invariant information. The temporal patterning of glomerular activity is then partly transmitted to relay neurons, the mitral and tufted cells.

At the Bulbar Level

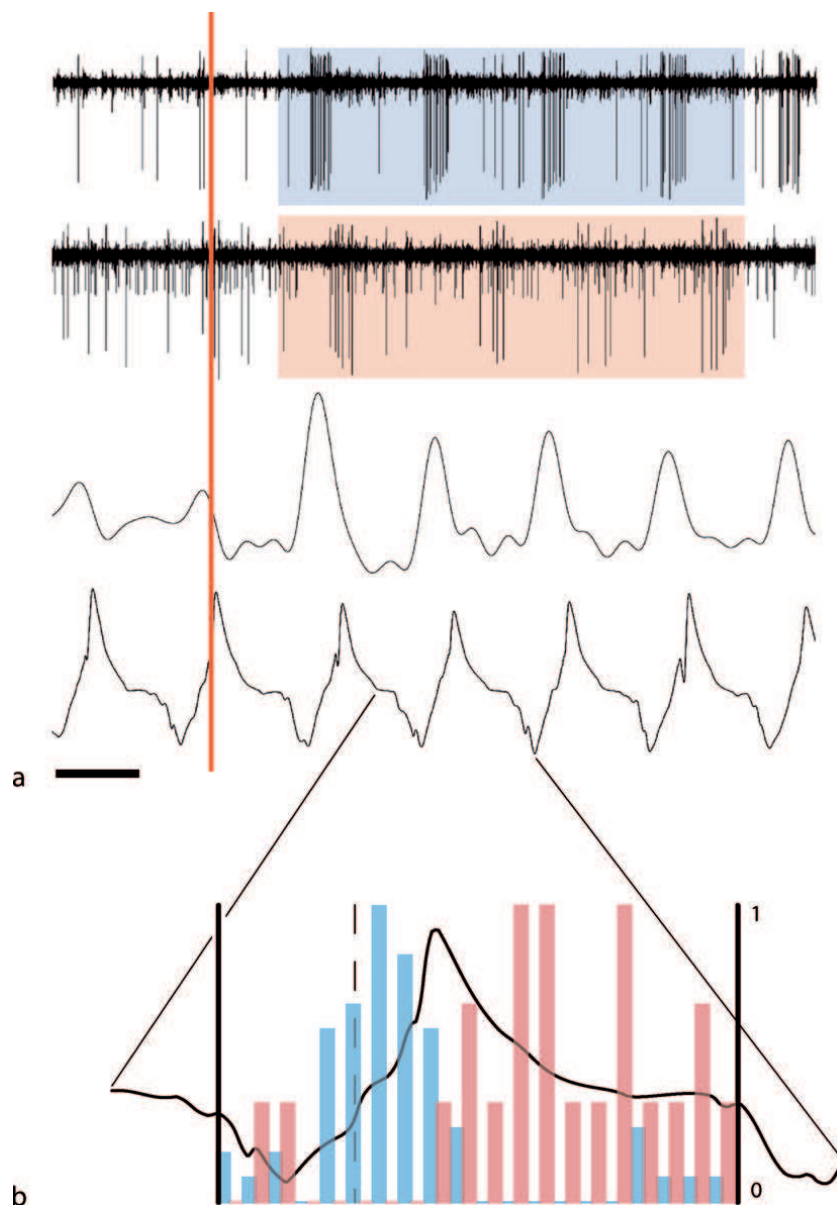
Traditionally, the temporal aspects of coding have been mainly investigated by extracellular unitary recording methods. Most works agree with the observation that periodic sampling of odors influences bulbar activity spiking discharges both in the OB and the piriform cortex. Particularly, mitral cells, OB secondary neurons, show a definite temporal pattern of firing with respect to particular phases of the respiratory cycle [2] (see Fig. 2).

Responses are not static but evolve over the time of a respiratory cycle. An important phase in the respiratory cycle is the transition epoch between inhalation and exhalation: around this point, spike discharges present the maximum of activation or suppression. This point represents also the maximum of recruitment of sensory neurons. These respiratory related oscillations act by enhancing the temporal precision of spike discharge [3]. Odor representation is relevant when the activity is considered over a population of mitral cells. Indeed, no individual unit is able to reliably discriminate between odorant stimuli. On the contrary, a distinct representation of odorants, even as similar as enantiomers, is possible when considering responses from a population of mitral cells integrated over single respiratory cycle.

Respiratory-phase information seems to be concentration-invariant since the profile of mitral cell responses relative to the respiratory phase is relatively unaffected by changes in odor concentration. Concentration coding rather relies on the latency and number of spikes in a burst relative to the respiratory cycle: mitral cells respond to stronger odorant stimulation with more spikes per burst and a shorter latency to the time of the first spike.

Glomerular and mitral dynamics probably contribute to the representation of odorant information. Firstly, the cortex would recognize the temporal sequence of glomerular activity patterns and/or the temporal characteristics of each glomerulus response within the sequence. This sequence is determined by the chemical nature of odor, the sniffing behavior and the sampling-related mechanisms. Then, within this sequence, odor representation would be refined by the dynamic map of mitral cells respiratory-phased activities which is more related to the intrinsic network connectivity.

Behaviorally, ►odor discrimination can be achieved in a single sniff both in animal (rodent, rabbit) and human, implying that odor can be represented within a single respiratory cycle. In rodents, there is a speed-accuracy trade-off in olfactory discrimination,



Temporal Coding. Figure 2 Respiration-related activity of mitral cells. (a) *Top traces*: unitary extracellular activity from two simultaneously recorded mitral cells (raw signal band-pass filtered: 300–3000 Hz). *Lower trace*: bulbar LFP (raw signal band-pass filtered: 0.5–5 Hz). *Bottom trace*: Respiratory monitoring (negative/positive deflection: inspiration/expiration). Time bar: 500 ms. Vertical red bar: odor stimulation onset. Low frequencies in the LFP signal follow the respiratory rhythm with peak activity occurring at the inspiration/expiration transition point. Both mitral cells emit odor evoked spike bursts at different epochs of the respiratory cycle. (b) Respiration-cycle triggered histogram showing the average spike distribution of both cellular activities relative to the respiratory cycle. Vertical axis: normalized firing rate; a value of 1 corresponds to the maximum rate. Blue/red bars indicate the average firing rate of cells 1 and 2 over the four respiratory cycles included in blue/red boxes on top traces.

discrimination being less accurate or longer when odors are very similar. In any case, each sniff can be considered as a complete snapshot of the olfactory environment [4]. Perception can be modified by changes in sniffing frequency. For example, different bulbar maps depending on sniffing frequency can represent the same stimulus. Particularly, rapid sniffing allows the animal to improve detection of a novel

odor in the odor landscape [5]. Thus, by regulating its sniffing rate and depth, the behaving animal can influence the representation of odor stimulus and then its perception. This led some authors to the conclusion that the sniff itself is part of the olfactory percept [6].

In non mammalian animals, a slow dynamics exists which also depends on odor sampling process and which could reproduce the slow breathing rhythm: flicking in

crustaceans, antenna movements in insects or coughing in fish, all of these sampling mechanisms represent an analogous to sniffing behavior, both in function and frequency. The representation of odors evolves along the time: early representations are a coarse categorization of the odor while the late representations become sharp images of the odor, allowing for fine discrimination.

The slow timescale related to sampling process can thus be considered as a first temporal cue in odor coding.

A Fast Time Scale Related to Network Dynamics

At the bulbar and cortical levels, additionally to this slow temporal reference, the network produces another signal that may be used as time basis: the fast network oscillations of the LFPs. The oscillatory nature of LFPs may be exploited by the system as a common clock, a temporal reference for different cells or diverse areas. Stimulus-evoked oscillatory synchronization of neurons results in the forming of a neural assembly in which neurons are bound temporally: neurons from a same assembly fire synchronously and in relation with the LFP oscillation phase. In such a coding principle, the relation between LFP oscillations and unitary activities is the relevant parameter for odor encoding.

In locusts, an individual neuron of the antennal lobe (analogous to the mammalian OB) synchronizes with different neurons at different epochs of the oscillatory response. Each odor is thus represented by a specific sequence of activated neurons that synchronize at different cycles of an oscillatory population response [7]. In fishes, the strength of coupling between LFP oscillations and spikes of relay neurons determines the nature of the information conveyed: spikes tightly coupled with the oscillation convey information about odor category whereas the less synchronized spikes from the same population of neurons convey information about precise odor identity [8]. In mammals, such mechanisms have not been described. Even if mitral cell spikes preferentially occur during the troughs of gamma oscillations, no simple rule has been revealed indicating a relation between odorant quality and pattern of LFP/spikes coupling. Bulbar processing in mammals is probably more complex due to the higher complexity of the network and its entries, and to the existence of several oscillatory regimes. Indeed, oscillatory activity is related to respiratory cycle in freely-breathing animals (see Fig. 3).

During odorant stimulation, LFP alternatively oscillates in the gamma range (40–80 Hz) around the inspiration-expiration transition epoch and in the beta range (15–35 Hz) during the other respiratory phases [2]. At least in anesthetized animals, the pattern of beta/gamma alternation depends on odorant quality and/or intensity. The hypothesis can be advanced that synchrony on gamma and/or beta oscillations would

selectively tag the activity of neurons that code for one odor. The subpopulation of synchronized mitral cells could be recognized as an assembly by coincidence detection mechanisms in the olfactory cortex. During gamma regime, the oscillation synchronized neuronal map would represent the perceptual significance of odour (chemical features, concentration...); during beta regime, the oscillation synchronized neuronal map would represent the contextual significance of odor (ecological significance, significance in a learning task...).

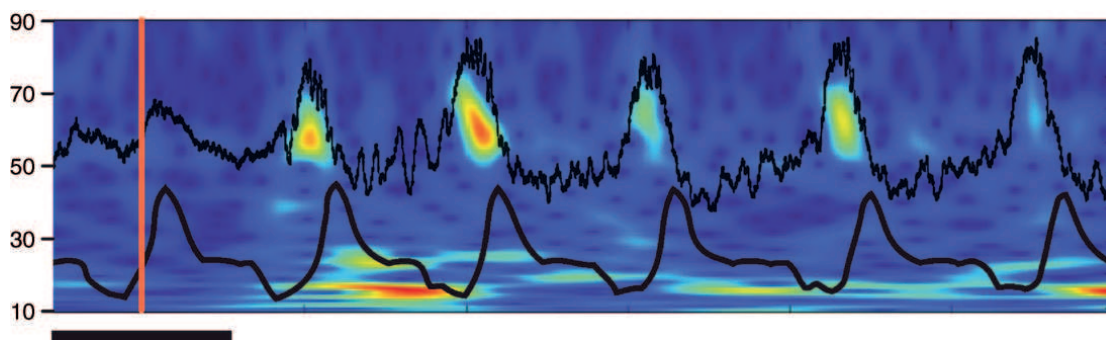
Behaviorally, does the system use the oscillations it produces? The best argument today comes from a work in the honeybee, using a behavioral learning paradigm. It has been shown that altering synchronization of neurons impairs the discrimination of molecularly similar odorants. Thus, oscillatory synchronization of neuronal assemblies is essential for fine sensory discrimination [7].

In the mammal, the functional role of oscillatory synchronizations is still hypothetical. In the olfactory bulb and cortex of the behaving rat, odor presentation induces a power decrease in gamma oscillations and an increase in power of beta oscillations. In the trained rat, odorant stimulation evokes a spatial distribution of oscillatory activity which depends on the chemical nature of the stimulus, but also on its behavioral meaning [9]. Indeed, on the one hand, beta LFPs oscillations spatial map is characteristic of the odor; on the other hand, the emergence of a powerful odor-induced beta oscillatory activity is predictive of behavioral odor recognition.

Conclusions

In summary, odor information is represented in the bulbo-cortical network by (i) the spatio-temporal sequence of activated glomeruli, (ii) the spatial combination of active neurons, (iii) the slow temporal sequence of activity patterns imposed by sampling-related process, (iv) the rapid synchronization of neuronal subpopulations relative to the network oscillatory regime. Therefore coding in the olfactory system is not a static phenomenon but a dynamical process with different temporal components, each of them probably readout by an adapted mechanism. This spatio-temporal representation is moreover dynamically reorganized by experience.

Sampling related process and odor characteristics impose the slow temporal dynamics, while intrinsic network dynamics established the fast LFP oscillatory regimes. Thus both dynamics are generated by system functioning. Dynamical representation of odors can nevertheless stand for a code provided that the neural network uses these temporal clues as a computational variable for coding. Firstly, the slow respiration-related rhythm could subserve a filtering function whereby



Temporal Coding. Figure 3 Odor-evoked LFP oscillatory activity in the olfactory bulb. *Foreground, top:* LFP recording, raw signal (0–5000 Hz); *bottom:* respiratory monitoring. *Background:* Time frequency representation of the raw LFP signal. x-axis = time, y-axis = frequency (in Hz). Time bar: 500 ms. Energy is color coded: the warmer the color the higher the amplitude of the oscillation in the signal. The oscillatory activity occurs in bursts, alternating between the beta range (10–35 Hz) and the gamma range (40–90 Hz) frequencies. The occurrence of oscillatory bursts is patterned by the respiratory cycle, with gamma bursts occurring around the inspiration/expiration transition and beta bursts occurring during the expiration phase.

neuronal responses could be selected on the basis of their respiratory phase. Such a functional phase-coding relative to theta cycle (i.e. related to respiratory frequency) has been evidenced in hippocampus place cells [10]. Secondly, the fast network oscillations probably intervene in a second step by refining the pattern of activated neurons through a synchronization binding process. This coding principle is better understood in other systems [10]. In such conditions, temporal dynamics, although epiphenomenal, are used by the system and thus may be considered as supporting temporal coding. The ultimate evidence would be provided in mammals if behavioral experiments could show changes in behavior in relation with a modification of the bulbo-cortical dynamics.

References

1. Spors H, Wachowiak M, Cohen LB, Friedrich RW (2006) Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. *J Neurosci* 26:1247–1259
2. Buonviso N, Amat C, Litaudon P (2006) Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. *Chem Senses* 31:145–154
3. Schaefer AT, Margrie TW (2007) Spatiotemporal representations in the olfactory system. *Trends Neurosci* 30:92–100
4. Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF (2006) The sniff as a unit of olfactory processing. *Chem Senses* 31:167–179
5. Verhagen JV, Wesson DW, Netoff TI, White JA, Wachowiak M (2007) Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 10:631–639
6. Mainland J, Sobel N (2006) The sniff is part of the olfactory percept. *Chem Senses* 31:181–196
7. Laurent G (2002) Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nat Rev Neurosci* 3:884–895
8. Friedrich RW (2006) Mechanisms of odor discrimination: neurophysiological and behavioral approaches. *Trends Neurosci* 29:40–47
9. Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N (2004) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? *J Neurosci* 24:389–97
10. Fries P, Nikolic D, Singer W (2007) The gamma cycle. *Trends Neurosci* doi: 10.1016/j.tins.2007.05.005

D Communications affichées

Achems : Association for Chemoreception Sciences
ECRO : European Chemoreception Research Organisation
ISOT : International Symposium on Olfaction and Taste

D.1 ECRO 2004

DYNAMIC ACTIVATION OF NEURON ASSEMBLIES AS A MECHANISM
FOR ODOR ENCODING IN THE MAMMALIAN BRAIN :
AN ELECTROPHYSIOLOGICAL INVESTIGATION IN THE RAT
OLFACTORY BULB USING LFP AND EXTRACELLULAR ACTIVITY
RECORDINGS.

Tristan Cenier, Corine Amat, Samuel Garcia, Philippe Litaudon, Stéphane Roux and Nathalie Buonviso
ECRO 2004, Dijon, France, 12–15 September 2004.

THE AIM OF OUR WORK was to study the encoding strategy used by the mammalian brain structures dedicated to olfactory perception to represent odorants. The works of Laurent's team demonstrated that, in the insect, odor is encoded by spatiotemporal activity patterns across dynamic assemblies of neurons, synchronized in regard to an oscillatory global activity. We wondered if such a coding scheme could be found in mammals where different oscillatory regimes exist, including respiration-related modulation, and where anatomical organization is more complex.

Our work was conducted on anaesthetized rats. Bulbar activity was recorded as a broadband signal (0–3000 Hz) using multichannel recording probes positioned in the mitral cell layer. From this signal were extracted both action potentials from different single cells and local field potentials (LFPs). The odorants used are simple aliphatic compounds, varying in carbon chain length and chemical function. Data processing are conducted in two phases : LFPs oscillatory activity is analyzed using morlet wavelet transformation and time/frequency representations to determine if the network activation pattern is odor-specific ; then cellular synchronization in regard to LFPs oscillatory regime are quantified during odor response.

Preliminary results indicate that LFPs present marked oscillations in the β (10–30 Hz) and γ (35–80 Hz) range. Plotting those oscillations on the respiratory cycle phases showed that different odorants elicited different LFPs activity patterns.

DYNAMIC ACTIVATION OF NEURON ASSEMBLIES AS A MECHANISM FOR ODOR ENCODING IN THE MAMMALIAN BRAIN : AN ELECTROPHYSIOLOGICAL INVESTIGATION IN THE RAT OLFACTORY BULB USING LFPs AND EXTRACELLULAR ACTIVITY RECORDINGS.

Tristan CENIER, Corine AMAT, Samuel GARCIA, Philippe LITAUDON, Stephane ROUX* and Nathalie BUONVISO

Neurosciences et Systèmes Sensoriels, CNRS IFR19, 50 avenue Tony Garnier, Lyon, France

* Laboratoire de Physique, ENS-Lyon, 46, allée d'Italie, Lyon, France

INTRODUCTION

Oscillatory synchronisation has been shown to be a key mechanism for information processing in different sensory systems. In the olfactory system of insect, Laurent's group showed that phase-locking of unitary activities onto field potential oscillations could play a role in temporal linking of activities for odour-specific neural assemblies. In order to test if such an organisation could exist in the mammalian olfactory bulb, we first intended to investigate in what extent the different components necessary for such a functioning could be found.

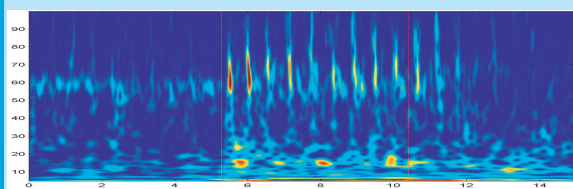
MATERIALS & METHODS

Experiments were performed on urethane anaesthetised rats. We used homologous series of alcohol and esters (carbon chain length: 5, 6, 7, 10), aldehyde and ketone of 7 carbon chain length and isoamyl acetate for odour stimulation. Animals were freely breathing. Each odour stimulation lasted 5 sec.

Bulbar activity was recorded as a broadband signal (0-5000 Hz) using 16-channel probes positioned in the mitral cell layer. Single-unit activity was extracted by band-passing the raw signal from 300 to 5000 Hz; LFPs were obtained by band-passing the signal at 0.1-200 Hz.

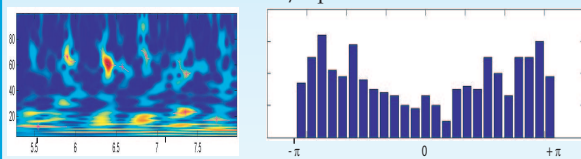
RESULTS

Time-Frequency analysis



Time-frequency analysis (complex Morlet wavelet) revealed oscillatory activities in β (15-35 Hz) and γ (40-80 Hz) range; these 2 regimes occur alternatively according to the respiratory phase.

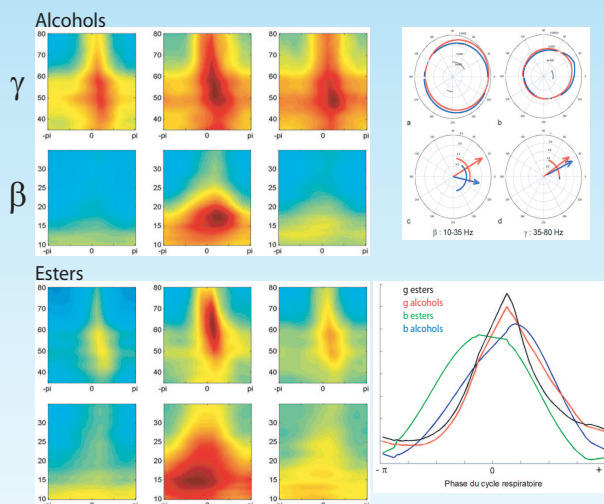
LFPs / Spikes



To investigate the relation between Mitral/Tufted cells activity and LFP oscillations, oscillation phase was extracted from the time-frequency representation. The phase-locking of spikes with β and γ epochs was evaluated for each cell.

The odour-evoked spike discharges of Mitral/Tufted cells tend to phase-lock within γ range LFP oscillations. Results on phase-locking within β range are not available yet.

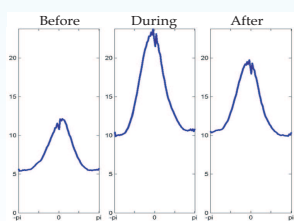
Respiratory phase-Frequency analysis



Temporal coordinates of signal were then converted into phase coordinates as a function of respiratory cycle. In this representation, transition point between inspiratory and expiratory phases (I/E) was assigned to 0.

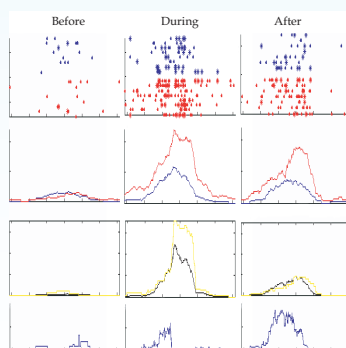
Odours with different chemical function evoke oscillatory activities:
 - with similar phase but different amplitudes in the β band.
 - with different phase and amplitude in the γ band.

Global spike rate

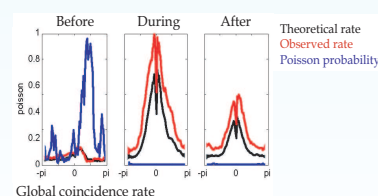


Globally, odours induce a maximum increase in Mitral/Tufted cells discharge around the transition I/E point.

Individual pair treatments



Global coincidence rate



Statistically significant epochs of synchronised firings is calculated as a function of respiratory phase. Maximum spike coincidence occurs around I/E transition point. This rate is significant for 1, 2, and 5 ms coincidence bin widths, not for larger ones. Moreover, coincidence rate is significantly high for cells separated by 50-100 μm , while not significantly different for units separated by 500-700 μm .

CONCLUSIONS

Those preliminary results show that :

- 1) LFP signals a fluenced by the chemical function of the odorant molecules
- 2) Maximal coincidence rate between Mitral/Tufted cells spikes occurs around the I/E transition epoch ; i.e. during the γ oscillatory episodes
- 3) Mitral/Tufted cells spikes tend to be phase-locked with γ oscillations.

All the basic components described as essential in a dynamic neuronal assembly processing seem to be present in the mammalian olfactory bulb. Complementary studies are in progress to determine if those elements are relevant in odour coding.

D.2 ECRO 2006

ODOR-EVOKED LFP OSCILLATIONS IN THE OLFACTORY BULB : A CODE FOR ODORANT MOLECULAR FEATURES ?

Tristan Cenier, Samuel Garcia, Stéphane Roux, Philippe Litaudon, Corine Amat and Nathalie Buonviso.
ECRO 2006, Granada, Spain, 4–8 September 2006.

A CENTRAL QUESTION FOR CHEMICAL SENSES is understanding the way odorant molecules are represented in the brain. It has been shown that the olfactory system recognizes some particular structural features of the molecules which are represented through a spatio-temporal pattern. 2DG studies showed that glomerular responses are globally chemotopic, so that pairs of odorants with the smallest difference in molecular features evoked the most similar patterns (Johnson and Leon, 2005). We wanted to test if the same observation could be made on the temporal structure of bulbar activity. Since local field potentials (LFPs) have been shown to play an important role in information coding, we focused on the relationships between odorant chemical features and LFP oscillation patterns. In the rat olfactory system, the LFPs display oscillatory epochs in two separate frequency bands : bêta (10–35 Hz) and gamma (40–80 Hz), these epochs alternating with the respiratory cycle.

We recorded the LFPs in the olfactory bulb of urethane anesthetized, freely breathing rats, in response to series of aliphatic odorants varying subtly in their molecular features (carbon chain length and functional group). Our results showed that, regardless to the nature of the odorant, the gamma epochs always occur at the transition between inspiration and expiration. Conversely, the position, duration and amplitude of bêta oscillatory epochs in the respiratory cycle depend on both the functional group and the carbon chain length of the molecule. We have also noticed that all odorants are not equally capable of triggering oscillations in bêta, gamma or both bands.

Our results suggest that the code for odorant quality may be partially contained in the oscillations generated by the system.

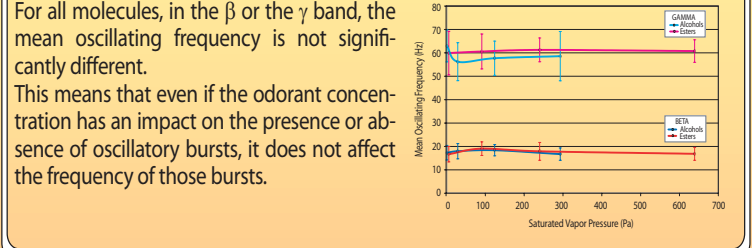
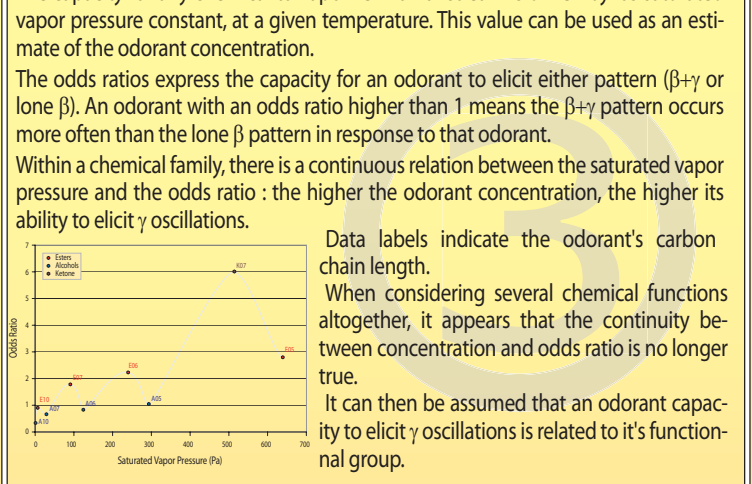
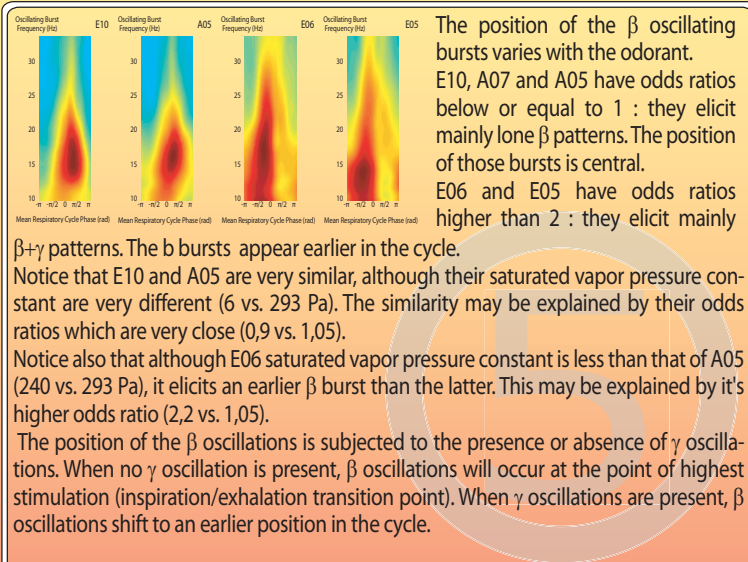
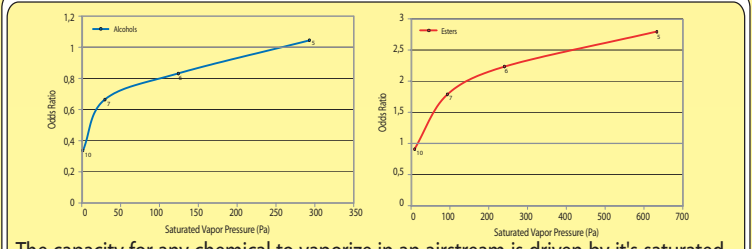
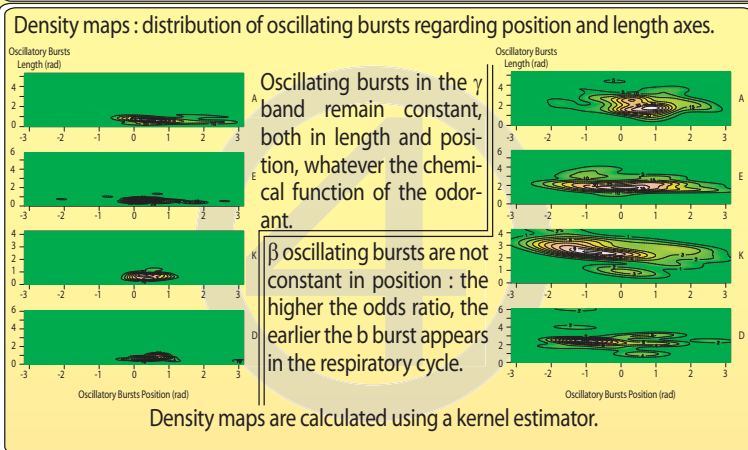
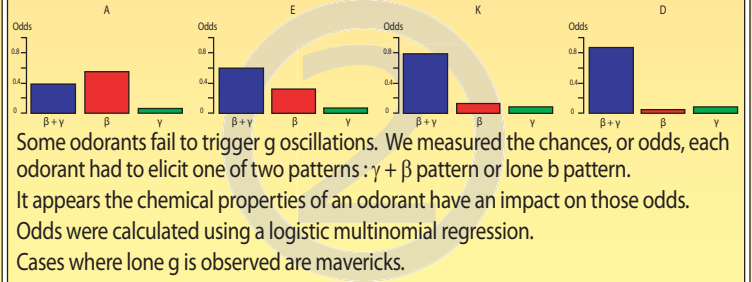
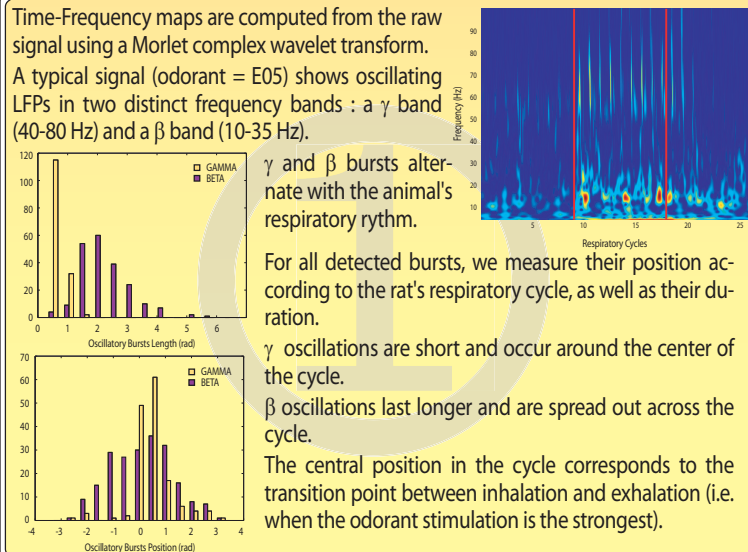
ODOR-EVOKED LFP OSCILLATIONS IN THE OLFACTORY BULB: A CODE FOR ODORANT MOLECULAR FEATURES?

T. Cenier^(a), S. Garcia^(a), S. Roux^(b), P. Litaudon^(a), C. Amat^(a) and N. Buonviso^(a)
 a Neurosciences & Systèmes Sensoriels, Université Lyon 1 – CNRS, UMR 5020, 50 avenue Tony Garnier, Lyon, France.
 IFR 19, Institut Fédératif des Neurosciences de Lyon.
 b Laboratoire de Physique, Ecole Normale Supérieure de Lyon, UMR 5672, 46 allée d'Italie Lyon, France.



A central question for chemical senses 2DG studies showed that glomerular is understanding the way odorant responses are globally chemotopic, so molecules are represented in the that pairs of odorants with the small-brain. It has been shown that the olfactory system recognizes some particular structural features of the molecules (Johnson and Leon, 2005). We wanted which are represented through a to test if the same observation could be made on the local field potentials.

Animals are Urethane anaesthetized, freely breathing, male Wistar rats
Recordings are performed in the olfactory bulb's mitral cell layer with a multi-channel Neuro-nexus probe.
Signals are acquired full band from 0 to 5 kHz and sampled at 10 kHz.
Respiration is recorded using a custom made airflow sensor device.
Odorants are aliphatic linear compounds, varying in carbon chain length (5, 6, 7 or 10 carbons) and chemical functions : Alcohol, Esters, Ketone and Aldehyde. They are later referred to as e.g. A06 or K07 where A or K stands for the chemical function and 06 or 07 the carbon chain length.



Odorants differ in their capacity to elicit β or γ oscillations. The major parameter determining the oscillatory pattern is the chemical functional group. Within a chemical family, the main parameter is the saturated vapor pressure constant. We observe no continuum in frequency between β and γ bursts event : this suggests that β or γ bursts probably originate in two distinct mechanisms. To some extent we can say that some aspects of the odorant's chemical properties are embedded in the LFPs, suggesting that the olfactory system may use the oscillations it generates to code the odorant quality.

D.3 ECRO 2008

BÊTA/GAMMA ALTERNATION IN THE OLFACTORY BULB OF THE ANESTHETIZED RAT : IN THE PURSUIT OF UNDERSTANDING MECHANISMS.

Tristan Cenier, Nicolas Fourcaud-Trocmé and Nathalie Buonviso
ECRO 2008, Portoroz, Slovenia, 3-7 September 2008.

IN THE ANESTHETIZED RODENT olfactory bulb (OB), the network temporal dynamics is characterized by local field potential (LFP) oscillations whose frequencies alternate between bêta (15–30 Hz) and gamma (40–90 Hz) ranges, this alternation being highly dependent on the respiratory cycle. The presence, amplitude and frequency of these rhythms have been shown to depend on the animal behavioural state or learning experience. Understanding the origin of these rhythms and their alternation is of a great importance to understand olfactory coding at early cortical stages.

Here, we investigated the mechanisms underlying the generation of these oscillations using a current source-density (CSD) analysis of LFP bulbar signals. In parallels, we used a pharmacological approach to understand the origin of alternation between both regimes. Both studies were performed in the OB of freely breathing animals. CSD : The use of 16-channel silicon probes give us access to the LFP in all layers of the olfactory bulb and we took advantage of the laminar structure of the bulb to perform a linear CSD analysis. Efficient automatic detection of phase and amplitude of oscillatory episodes allowed us to average CSD maps across oscillation cycles of the same frequency range. Finally multiunit activity (MUA) was used to relate CSD maps to spiking activity in the different layers. Pharmacology : GABA_A agonist (muscimol) and antagonist (bicuculine) were locally injected in the neighborhood of recording probes. Time-frequency maps of bulbar LFPs obtained under bicuculine or muscimol conditions were compared to control ones.

Our results show that bêta and gamma rhythms display different CSD maps, which underlies different generation mechanisms. In particular, we observe that gamma rhythm seems related to a balanced interplay between excitatory mitral cells and inhibitory granule cells. On the contrary, bêta oscillation appears dominated by mitral cells with only poor synchronization of granule cells. Preliminary results of pharmacological study revealed that gamma oscillations seem to emerge when the ratio activation/inhibition in the network is high while they tend to disappear when this ration is low.

Overall these results give new insights on the network spatio-temporal activity underlying oscillatory dynamics in the mammalian OB.

Beta/gamma alternation in the olfactory bulb of the anesthetized rat: in the pursuit of understanding mechanisms

Tristan Cenier, Nicolas Fourcaud-Trocmé and Nathalie Buonviso

Neurosciences sensorielles, Comportement, Cognition. CNRS UMR5020, Université Lyon 1, IFNL Lyon, FRANCE

INTRODUCTION

In the anesthetized rodent olfactory bulb (OB), the network temporal dynamics is characterized by local field potential (LFP) oscillations whose frequencies alternate between beta (15-30Hz) and gamma (40-90Hz) ranges, this alternation being highly dependent on the respiratory cycle. The presence, amplitude and frequency of these rhythms have been shown to depend on the animal behavioural state or learning experience. Understanding the origin of these rhythms and their alternation is of a great importance to understand olfactory coding at early cortical stages.

Here, we investigated 1) the mechanisms underlying the generation of these oscillations using a current source-density (CSD) analysis of LFP bulbar signals 2) the synaptic conditions allowing the expression of gamma or beta rhythm in the network using a pharmacological approach. Both studies were performed in the freely breathing rat.

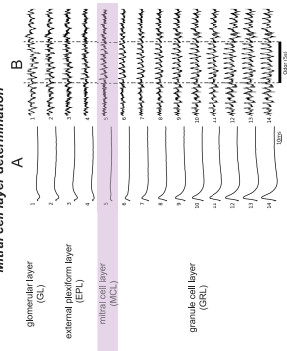
1 - CSD study

The use of 16-channel silicon probes (NeuroNexus Technologies) gave us access to the LFP in all layers of the OB and we took advantage of the laminar structure of the OB to perform a linear CSD analysis. Efficient automatic detection of phase and amplitude of oscillatory episodes allowed us to average CSD maps across oscillation cycles of the same frequency range.

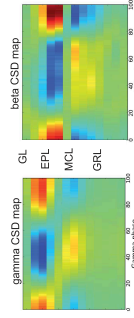
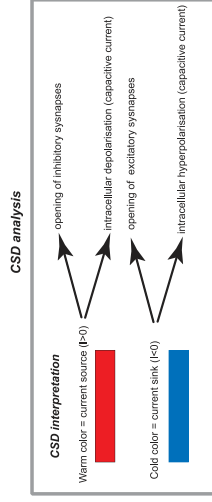
Multielectrode (MUA) was recorded at the same time. It was used to relate CSD maps to spiking activity in the different layers.

Centrifugal input was blocked by lidocaine injection into the olfactory peduncle.

Mitral cell layer determination

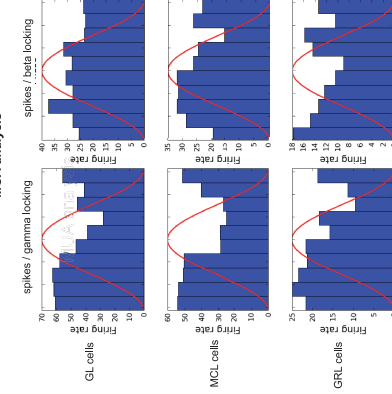


MCL was determined by LOT-evoked electrical injection (three injections). A: Typical bulbar field potentials recorded by an electrical stimulation of the lateral olfactory tract. B: Typical bulbar signals during odorant stimulation protocol.



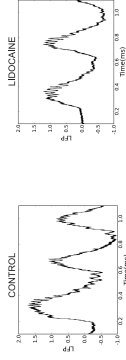
Gamma and beta oscillations clearly display different CSD maps. The upper part of the EPL is activated during gamma oscillations; current sinks/sources inversion occurs in more peripheral layers than for beta oscillations. In turn, a deeper part of the GRL is activated during beta oscillations.

MUA analysis



MUA recorded in all bulbar layers is strongly locked to gamma oscillation; only MUA recorded in MCL is locked with beta oscillations.

Centrifugal input blocking



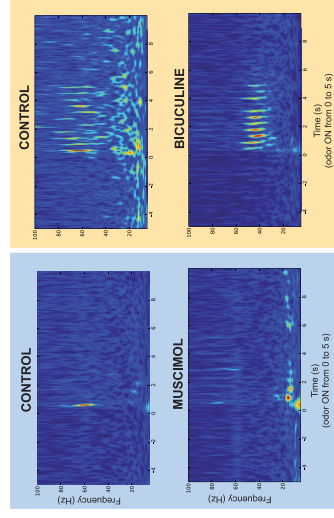
Blocking centrifugal input by lidocaine injection into the olfactory peduncle resulted in:

- a suppression of beta oscillations
- a 6% decrease in gamma oscillation frequency.

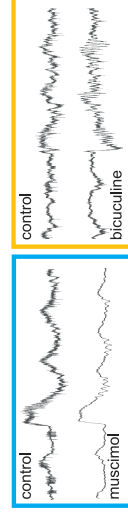
2 - Pharmacology

preliminary

We used a pharmacological approach to understand the origin of alternation between both regimes. GABA_A agonist (muscimol) and antagonist (bicuculline) were locally injected in the neighborhood of recording probes. Time-frequency maps of bulbar LFPs obtained under bicuculline or muscimol conditions were compared to control ones.



Typical Time-frequency maps of bulbar LFP signal. Effects of muscimol (20 mM) and bicuculline (20 mM) were recorded 1-2 min after drug injection.



Raw bulbar signal recorded in the MCL.

Effects on LFP oscillations

Muscimol dramatically decreased gamma oscillations while enhancing beta oscillations. Bicuculline dramatically increased gamma oscillations, sometimes leading to a beta suppression. It also induced a reversal in the slow respiratory modulation polarity (that we cannot explain yet...)

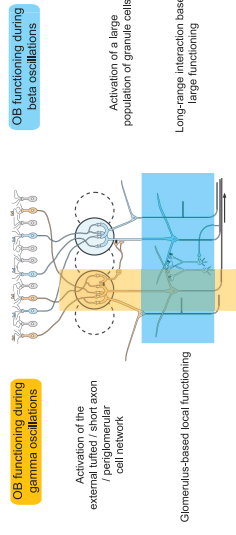
Effects on spiking activity

Muscimol suppressed spiking activity in the MCL. Bicuculline induced changes in the mitral/tufted cell activity behavior: spikes were much better phase-locked with gamma oscillations.

CONCLUSIONS

CSD study revealed that beta and gamma oscillations have different generation mechanisms: gamma oscillations involve the higher part of EPL while beta rhythm involves the lower part of EPL and a larger part of GRL. We hypothesize that, during gamma oscillations, the involvement of the interconnected network of excitatory juxtglomerular interneurons (external tufted and short axon) and inhibitory periglomerular cells results in a local functioning of the OB glomerular modules. Conversely, during beta oscillations, long range interactions between mitral cells through their dendro-dendritic synapses are favored by the implication of a larger population of granule cells, resulting in a more global functioning of the OB network.

Preliminary results of the pharmacological study suggest that gamma oscillations appear when the net resulting activation of the OB network is stronger than the global inhibition. Oppositely, beta oscillations emerge when the net resulting inhibition is stronger. This could explain 1) the exclusive occurrence of gamma oscillations at the time of maximum activation of neuroreceptors in the freely-breathing animal, 2) beta oscillation extinction when granular cell activation is considerably reduced by centrifugal feed-back suppression.



D.4 ISOT 2008

RESPIRATION-GATED FORMATION OF GAMMA AND BÊTA NEURAL ASSEMBLIES IN THE MAMMALIAN OLFACTORY BULB.

*Tristan Cenier, François David, Corine Amat, Philippe Litaudon, Samuel Garcia and Nathalie Buonviso.
ISOT/Achems, San Francisco, United-States, 21–27 July 2008.*

A GROWING BODY OF DATA suggests that information coding can be achieved not only by varying neuronal firing rate but also by varying spike timing relative to network oscillations. In the olfactory bulb (OB) of freely breathing anesthetized mammal, odorant stimulation induces a prominent oscillatory activity in local field potentials (LFP) in the bêta (15–30 Hz) and gamma (40–80 Hz) ranges, both regimes alternating during a respiratory cycle. At the same time, mitral/tufted (M/T) cells display respiration-modulated spiking patterns.

Using simultaneous recordings of M/T unitary activities and LFP activity, we analyzed for the first time the temporal relationships between M/T cell spiking activity and both OB bêta and gamma oscillations. We observed that M/T cell population displays a spontaneous rhythm process which does not seem to be related to LFP oscillations occurrence even though gamma oscillations are associated with a decrease in spike frequency. Among M/T cell population, cells exhibit a respiratory pattern which pre-tunes instantaneous frequencies to a gamma or bêta intrinsic regime. Consequently, M/T cell spikes undertake a phase-locking either with gamma or with bêta LFP oscillations according to their frequency range.

Our results suggest that slow respiratory dynamics pre-tune M/T cells to a preferential fast rhythm (bêta or gamma) so that a spike-LFP coupling might occur when units and oscillation frequencies are in a compatible range. This double locking process might define two complementary bêta- and gamma-neuronal assemblies along the time course of a respiratory cycle. Such neuronal assemblies may take part in distinct information treatment processes and fold olfactory inputs into shape, to be read by upstream structures.

RESPIRATION-GATED FORMATION OF GAMMA AND BETA NEURAL ASSEMBLIES IN THE MAMMALIAN OLFACTORY BULB



Kenner T., David F., Amat C., Litaudon P., Garcia S. and Buonviso N.

Neurosciences Sensorielles, Comportement, Cognition - UMR 5020 - Université Claude Bernard Lyon 1 - CNRS - Institut Fédératif de Neurosciences de Lyon

INTRODUCTION
Traditional studies on information coding have been carried out independently on either unitary or EEG activity. However, the current trend is to join both fields by focusing on temporal relationships between individual cell activity and population activity. Indeed, several studies in other systems suggest that such relationships could be a fundamental parameter for information processing.

METHODS
Using simultaneous recordings of mitral/tufted (M/T) unitary activities and LFP activity, we analyzed the temporal relationships between M/T cell spiking activity and LFP beta and gamma oscillations.
Recordings were performed using 16-channels silicone probes (NeuroNexus Technologies).
Oscillatory episodes were detected and characterized using a ridge extraction algorithm based on complex Morlet wavelet transform. Unitary events were time stamped. An absolute phase was assigned to each spike occurring during an oscillatory epoch, allowing the analysis of LFP-spike phase-locking.

CONCLUSION

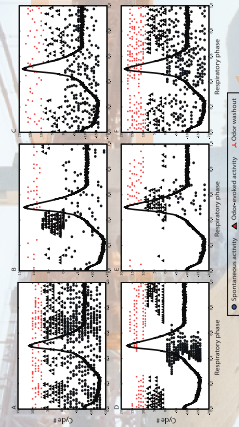
In M/T cells population, units exhibit a respiratory pattern that pre-tunes instantaneous frequencies to a gamma or beta regime. Consequently, M/T cells become phase-locked on either gamma or beta LFP oscillations according to their frequency range. This double locking process might define two complementary gamma- and beta- neural assemblies along the time course of a respiratory cycle.

RESULTS

- 1- M/T cells' discharges maintain temporal relationships either with gamma or with beta oscillations according to their respiratory patterning
- 2- LFP oscillations do not determine spiking frequencies but respiratory patterning does
- 3- Gamma phase-locking is permissive, beta-phase locking is restrictive

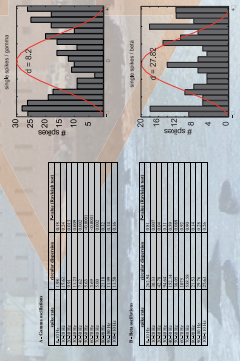
Spiking discharges

M/T spiking activities show respiration-dependent temporal patterns. Particularly, M/T activities can show a single peak in spike frequency around the transition between inspiration and expiration, or I/E transition, (S+ patterns). Conversely, activities can mark a decrease or stop firing around the I/E transition (S- patterns).



Respiration-dependant patterns of cellular activity

Ranges of compatible frequencies
Phase-locking between LFP and cells in the gamma range is very powerful: it can be attained for a wide range of spiking frequencies and even when a single spike is emitted by the cell during the gamma oscillatory episode.



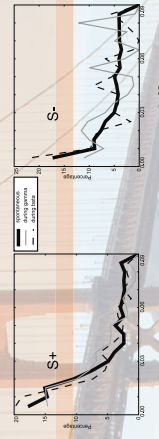
Conversely, coupling in the beta range is achieved when both frequencies are in a strict compatible range.

Different properties : different assemblies

LFP oscillations

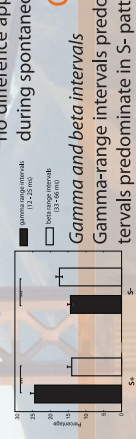
LFPs exhibit a gamma burst systematically around the transition epoch between inspiration and expiration (I/E). Beta episodes occur before and/or after I/E transition.

Coherence in respiratory phase



Global ISI distribution

S+ and S- patterns also differ in their ISI distribution. However, for both patterns, no difference appears when comparing their ISI distribution during spontaneous, beta, or gamma epochs.

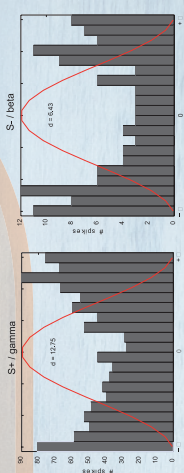


Gamma and beta intervals

Gamma-range intervals predominate in S+ patterns while beta-range intervals predominate in S- patterns.

Spikes / LFP relationships

S+ patterns phase-lock with gamma oscillations whereas S- patterns phase-lock with beta oscillations.



Coherence in LFP phase

TABLE DES FIGURES

1.1	Edgard Douglas Adrian	4
1.2	Trahison des images	6
1.3	Tonotopie cochléaire	9
1.4	Tonotopie du cortex auditif primaire	9
1.5	Arôme de fraise	10
1.6	L'appareil olfactif du rat	12
1.7	Structure laminaire du bulbe olfactif	13
1.8	Quelques constituants cellulaires du bulbe olfactif	16
1.9	Projections centripètes	19
1.10	Projections centrifuges	21
1.11	Cavités nasales chez l'homme	23
1.12	Cavités nasales chez le rat	24
1.13	Cils olfactifs de l'épithélium	25
1.14	Codage combinatoire des odeurs	27
1.15	Organisation des projections épithélio-bulbaires	29
1.16	Champ récepteur moléculaire	32
1.17	Cartes d'activation glomérulaires	34
1.18	Arborisations dendritiques des cellules mitrales	36
1.19	Rythmes du réseau bulbaire	42
1.20	Dynamique d'activation glomérulaire	44
1.21	Précision des décharges unitaires sur le rythme lent	48
1.22	Tracés de Rall & Shepherd	56
1.23	Système détecteur de synchronisations chez l'insecte	67

1.24 La théorie chromatographique de Mozell	72
2.1 OpenElectrophy	102
3.1 Variabilité de phase des oscillations bêta	107
3.2 Étude pharmacologique	110
3.3 Cadençage des cellules pendant le régime gamma	113
3.4 Alternance des assemblées	116
3.5 Rythme respiratoire chez le vigile	120
3.6 Gordon Shepherd	123

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, N. M., H. Spors, A. Carleton, T. W. Margrie, T. Kuner, and A. T. Schaefer (2004, Dec). Maintaining accuracy at the expense of speed : stimulus similarity defines odor discrimination time in mice. *Neuron* 44(5), 865–76.
- Adrian, E. D. (1942, Mar). Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. *J Physiol* 100(4), 459–73.
- Adrian, E. D. (1950, Nov). The electrical activity of the mammalian olfactory bulb. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 2(4), 377–88.
- Allison, A. C. (1953a). The morphology of the olfactory system in the vertebrates. *Biol. Rev.* 28, 195–244.
- Allison, A. C. (1953b, Apr). The structure of the olfactory bulb and its relationship to the olfactory pathways in the rabbit and the rat. *J Comp Neurol* 98(2), 309–53.
- Alonso, M., C. Violett, M.-M. Gabellec, V. Meas-Yedid, J.-C. Olivo-Marin, and P.-M. Lledo (2006, Oct). Olfactory discrimination learning increases the survival of adult-born neurons in the olfactory bulb. *J Neurosci* 26(41), 10508–13.
- Altman, J. (1969, Jul). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* 136(3), 269–93.
- Araneda, R. C., A. D. Kini, and S. Firestein (2000, Dec). The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat Neurosci* 3(12), 1248–55.

- Araneda, S., P. Bobillier, M. Buda, and J. F. Pujol (1980, Sep). Retrograde axonal transport following injection of (3h)serotonin in the olfactory bulb. i. biochemical study. *Brain Res* 196(2), 405–15.
- Aroniadou-Anderjaska, V., M. Ennis, and M. T. Shipley (1999, Jul). Dendrodendritic recurrent excitation in mitral cells of the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 82(1), 489–94.
- Astic, L. and D. Saucier (1986, Apr). Anatomical mapping of the neuroepithelial projection to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res Bull* 16(4), 445–54.
- Astic, L., D. Saucier, and A. Holley (1987, Oct). Topographical relationships between olfactory receptor cells and glomerular foci in the rat olfactory bulb. *Brain Res* 424(1), 144–52.
- Balu, R., P. Larimer, and B. W. Strowbridge (2004). Phasic stimuli evoke precisely timed spikes in intermittently discharging mitral cells. *J Neurophysiol* 92, 743–53. Journal Article.
- Ban, T. and K. Zyo (1962, Mar). Experimental studies on the fiber connections of the rhinencephalon. i. albino rat. *Med J Osaka Univ* 12, 385–424.
- Barone, F. C., M. J. Wayner, S. L. Scharoun, R. Guevara-Aguilar, and H. U. Aguilar-Baturoni (1981, Jul). Afferent connections to the lateral hypothalamus : a horseradish peroxidase study in the rat. *Brain Res Bull* 7(1), 75–88.
- Bhalla, U. S. and J. M. Bower (1997, Jul). Multiday recordings from olfactory bulb neurons in awake freely moving rats : spatially and temporally organized variability in odorant response properties. *J Comput Neurosci* 4(3), 221–56.
- Biju, K. C., D. R. Marks, T. G. Mast, and D. A. Fadool (2008, Jan). Deletion of voltage-gated channel affects glomerular refinement and odorant receptor expression in the mouse olfactory system. *J Comp Neurol* 506(2), 161–79.
- Bowery, N. G., A. L. Hudson, and G. W. Price (1987, Feb). Gabaa and gabab receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20(2), 365–83.
- Bressler, S. L. (1984, Mar). Spatial organization of eegs from olfactory bulb and cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 57(3), 270–6.

- Bressler, S. L. and W. J. Freeman (1980, Oct). Frequency analysis of olfactory system eeg in cat, rabbit, and rat. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 50(1-2), 19–24.
- Brosch, M., E. Budinger, and H. Scheich (2002, Jun). Stimulus-related gamma oscillations in primate auditory cortex. *J Neurophysiol* 87(6), 2715–25.
- Buck, L. and R. Axel (1991, Apr). A novel multigene family may encode odorant receptors : a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65(1), 175–87.
- Buck, L. B. (1992, Jun). The olfactory multigene family. *Curr Opin Neurobiol* 2(3), 282–8.
- Buonviso, N., C. Amat, and P. Litaudon (2006). Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. *Chem Senses* 31, 145–54. Review.
- Buonviso, N., C. Amat, P. Litaudon, S. Roux, J. P. Royet, V. Farget, and G. Sicard (2003). Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. *Eur J Neurosci* 17, 1811–9. Journal Article.
- Buonviso, N., M. A. Chaput, and F. Berthommier (1992, Aug). Temporal pattern analyses in pairs of neighboring mitral cells. *J Neurophysiol* 68(2), 417–24.
- Burke, B. C., W. J. Freeman, and H. J. Chang (1998, Apr). Optimization of olfactory model in software to give 1/f power spectra reveals numerical instabilities in solutions governed by aperiodic (chaotic) attractors. *Neural Netw* 11(3), 449–466.
- Buzsàki, G. and F. H. Gage (1989). The cholinergic nucleus basalis : a key structure in neocortical arousal. *EXS* 57, 159–71.
- Cajal, S. R. (1911). *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. Maloine, Paris.
- Cang, J. and J. S. Isaacson (2003, May). In vivo whole-cell recording of odor-evoked synaptic transmission in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 23(10), 4108–16.
- Carson, K. A. (1984, Jun). Quantitative localization of neurons projecting to the mouse main olfactory bulb. *Brain Res Bull* 12(6), 629–34.
- Castillo, P. E., A. Carleton, J. D. Vincent, and P. M. Lledo (1999, Nov). Multiple and opposing roles of cholinergic transmission in the main olfactory bulb. *J Neurosci* 19(21), 9180–91.

- Chabaud, P., N. Ravel, D. A. Wilson, A. M. Mouly, M. Vigouroux, V. Farget, and R. Gervais (2000, Oct). Exposure to behaviourally relevant odour reveals differential characteristics in rat central olfactory pathways as studied through oscillatory activities. *Chem Senses* 25(5), 561–73.
- Chaput, M. A. (2000). Eog responses in anesthetized freely breathing rats. *Chem Senses* 25, 695–701. t.
- Chaput, M. A., N. Buonviso, and F. Berthommier (1992). Temporal patterns in spontaneous and odour-evoked mitral cell discharges recorded in anaesthetized freely breathing animals. *Eur J Neurosci* 4, 813–822. Journal article.
- Chen, T.-W., B.-J. Lin, and D. Schild (2009, Feb). Odor coding by modules of coherent mitral/tufted cells in the vertebrate olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(7), 2401–6.
- Chen, W. R., G. Y. Shen, G. M. Shepherd, M. L. Hines, and J. Midtgaard (2002, Nov). Multiple modes of action potential initiation and propagation in mitral cell primary dendrite. *J Neurophysiol* 88(5), 2755–64.
- Chen, W. R. and G. M. Shepherd (1997, Jan). Membrane and synaptic properties of mitral cells in slices of rat olfactory bulb. *Brain Res* 745(1-2), 189–96.
- Chess, A., I. Simon, H. Cedar, and R. Axel (1994, Sep). Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell* 78(5), 823–34.
- Chu, D. C., R. L. Albin, A. B. Young, and J. B. Penney (1990). Distribution and kinetics of gabab binding sites in rat central nervous system : a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 34(2), 341–57.
- Cinelli, A. R., K. A. Hamilton, and J. S. Kauer (1995, May). Salamander olfactory bulb neuronal activity observed by video rate, voltage-sensitive dye imaging. iii. spatial and temporal properties of responses evoked by odorant stimulation. *J Neurophysiol* 73(5), 2053–71.
- Coopersmith, R. and M. Leon (1984, Aug). Enhanced neural response to familiar olfactory cues. *Science* 225(4664), 849–51.
- Csicsvari, J., B. Jamieson, K. D. Wise, and G. Buzsáki (2003, Jan). Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron* 37(2), 311–22.

- Davis, B. J., F. Macrides, W. M. Youngs, S. P. Schneider, and D. L. Rosene (1978, Jan-Feb). Efferents and centrifugal afferents of the main and accessory olfactory bulbs in the hamster. *Brain Res Bull* 3(1), 59–72.
- De Saint Jan, D., D. Hirnet, G. L. Westbrook, and S. Charpak (2009, Feb). External tufted cells drive the output of olfactory bulb glomeruli. *J Neurosci* 29(7), 2043–52.
- Desmaisons, D., J. D. Vincent, and P. M. Lledo (1999). Control of action potential timing by intrinsic subthreshold oscillations in olfactory bulb output neurons. *J Neurosci* 19, 10727–37. t.
- Didier, A., O. P. Ottersen, and J. Storm-Mathisen (1994, Dec). Differential subcellular distribution of glutamate and taurine in primary olfactory neurones. *Neuroreport* 6(1), 145–8.
- Døving, k. b. (1964). Studies of the relation between the frog's electro-olfactogram (eog) and single unit activity in the olfactory bulb. *Acta. physiol. scand.* 60, 150–163.
- Døving, K. B. (1987, Jun). Response properties of neurones in the rat olfactory bulb to various parameters of odour stimulation. *Acta Physiol Scand* 130(2), 285–98.
- Ennis, M., K. A. Hamilton, and A. Hayar (2007). *Sensory Neurochemistry* (3rd ed.), Volume Vol. 20, Chapter Neurochemistry of the main olfactory system, pp. 137–204. Springer, Heidelberg.
- Famiglietti, E. V. J. (1970, Jun). Dendro-dendritic synapses in the lateral geniculate nucleus of the cat. *Brain Res* 20(2), 181–91.
- Ferrer, N. G. (1969, Nov). Efferent projections of the anterior olfactory nucleus. *J Comp Neurol* 137(3), 309–20.
- Franks, K. M. and J. S. Isaacson (2006, Feb). Strong single-fiber sensory inputs to olfactory cortex : implications for olfactory coding. *Neuron* 49(3), 357–63.
- Frazier, L. L. and P. C. Brunjes (1988, Mar). Unilateral odor deprivation : early post-natal changes in olfactory bulb cell density and number. *J Comp Neurol* 269(3), 355–70.
- Freeman, W. J. (1972a, Nov). Depth recording of averaged evoked potential of olfactory bulb. *J Neurophysiol* 35(6), 780–96.

- Freeman, W. J. (1972b). Linear analysis of the dynamics of neural masses. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1, 225–56.
- Freeman, w. j. (1975). *Mass Action in the Nervous System : Examination of Neurophysiological Basis of Adoptive Behavior Through EEG*. Academic, New York.
- Freeman, W. J. (1978, May). Spatial properties of an eeg event in the olfactory bulb and cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 44(5), 586–605.
- Freeman, W. J. (1981). A physiological hypothesis of perception. *Perspect Biol Med* 24(4), 561–92.
- Freeman, W. J. (1994, Nov). Neural networks and chaos. *J Theor Biol* 171(1), 13–8.
- Freeman, W. J. and W. Schneider (1982, Jan). Changes in spatial patterns of rabbit olfactory eeg with conditioning to odors. *Psychophysiology* 19(1), 44–56.
- Freeman, W. J. and C. A. Skarda (1985, Dec). Spatial eeg patterns, non-linear dynamics and perception : the neo-sherringtonian view. *Brain Res* 357(3), 147–75.
- Friedman, D. and B. W. Strowbridge (2003, May). Both electrical and chemical synapses mediate fast network oscillations in the olfactory bulb. *J Neurophysiol* 89(5), 2601–10.
- Friedrich, R. W., C. J. Habermann, and G. Laurent (2004). Multiplexing using synchrony in the zebrafish olfactory bulb. *Nat Neurosci* 7, 862–71. †, P.H.S.
- Friedrich, R. W. and G. Laurent (2001, Feb). Dynamic optimization of odor representations by slow temporal patterning of mitral cell activity. *Science* 291(5505), 889–94.
- Friedrich, R. W. and M. Stopfer (2001, Aug). Recent dynamics in olfactory population coding. *Curr Opin Neurobiol* 11(4), 468–74.
- Gall, C., K. Sumikawa, and G. Lynch (1990, Sep). Regional distribution of mrna for a putative kainate receptor in rat brain. *Eur J Pharmacol* 189(2-3), 217–21.
- Galán, R. F., N. Fourcaud-Trocmé, G. B. Ermentrout, and N. N. Urban (2006, Apr). Correlation-induced synchronization of oscillations in olfactory bulb neurons. *J Neurosci* 26(14), 3646–55.

- Gao, Y. and B. W. Strowbridge (2009, May). Long-term plasticity of excitatory inputs to granule cells in the rat olfactory bulb. *Nat Med*.
- Gervais, R. (1983). Caractéristiques fonctionnelles de l'entrée olfactive pendant la veille et le sommeil. *Thèse d'état, soutenue devant l'université Claude Bernard, Lyon.*
- Giustetto, M., P. Bovolin, A. Fasolo, M. Bonino, D. Cantino, and M. Sassoe-Pognetto (1997, Feb). Glutamate receptors in the olfactory bulb synaptic circuitry : heterogeneity and synaptic localization of n-methyl-d-aspartate receptor subunit 1 and ampa receptor subunit 1. *Neuroscience* 76(3), 787–98.
- Giustetto, M., J. Kirsch, J. M. Fritschy, D. Cantino, and M. Sassoè-Pognetto (1998, Jun). Localization of the clustering protein gephyrin at gabaergic synapses in the main olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol* 395(2), 231–44.
- Goldberg, S. J. and D. G. Moulton (1987, May). Olfactory bulb responses telemetered during an odor discrimination task in rats. *Exp Neurol* 96(2), 430–42.
- Gray, C. M., P. König, A. K. Engel, and W. Singer (1989, Mar). Oscillatory responses in cat visual cortex exhibit inter-columnar synchronization which reflects global stimulus properties. *Nature* 338(6213), 334–7.
- Gray, C. M. and W. Singer (1989, Mar). Stimulus-specific neuronal oscillations in orientation columns of cat visual cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(5), 1698–702.
- Gray, C. M. and J. E. Skinner (1988a). Centrifugal regulation of neuronal activity in the olfactory bulb of the waking rabbit as revealed by reversible cryogenic blockade. *Exp Brain Res* 69(2), 378–86.
- Gray, C. M. and J. E. Skinner (1988b). Field potential response changes in the rabbit olfactory bulb accompany behavioral habituation during the repeated presentation of unreinforced odors. *Exp Brain Res* 73(1), 189–97.
- Graziadei, P. P. and G. A. Graziadei (1979, Feb). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. i. morphological aspects of differentiation and structural organization of the olfactory sensory neurons. *J Neurocytol* 8(1), 1–18.

- Grosmaître, X., L. C. Santarelli, J. Tan, M. Luo, and M. Ma (2007, Mar). Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat Neurosci* 10(3), 348–54.
- Gurdjian, E. S. (1925). Olfactory connections in the albino rat, with special reference to the stria medullaris and the anterior commissure. *J. Comp. Neurol.* 38, 127–163.
- Haberly, L. B. and J. L. Price (1977, Jun). The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 129(1), 152–7.
- Haberly, L. B. and J. L. Price (1978a, Apr). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. *J Comp Neurol* 178(4), 711–40.
- Haberly, L. B. and J. L. Price (1978b, Oct). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. ii. systems originating in the olfactory peduncle. *J Comp Neurol* 181(4), 781–807.
- Hamauzu, Y. (1969). Odor perception measurement by the use of odorless room. *Sangyo Kogai* 5, 718–723.
- Hamilton, K. A. and D. M. Coppola (2003, Feb). Distribution of *glur1* is altered in the olfactory bulb following neonatal naris occlusion. *J Neurobiol* 54(2), 326–36.
- Harding, B. N. (1971, Nov). Dendro-dendritic synapses, including reciprocal synapses, in the ventrolateral nucleus of the monkey thalamus. *Brain Res* 34(1), 181–5.
- Hebb, D. O. (1949). *The organization of behavior, a neuropsychological theory*. New York : Wiley.
- Heimer, L. (1968, Nov). Synaptic distribution of centripetal and centrifugal nerve fibres in the olfactory system of the rat. an experimental anatomical study. *J Anat* 103(Pt 3), 413–32.
- Hopfield, J. J. and C. D. Brody (2001, Jan). What is a moment ? transient synchrony as a collective mechanism for spatiotemporal integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(3), 1282–7.
- Igarashi, K. M. and K. Mori (2005, Feb). Spatial representation of hydrocarbon odors in the ventrolateral zones of the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 93(2), 1007–19.

- Imamura, K., N. Mataga, and K. Mori (1992, Dec). Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. i. aliphatic compounds. *J Neurophysiol* 68(6), 1986–2002.
- Inaki, K., Y. K. Takahashi, S. Nagayama, and K. Mori (2002, May). Molecular-feature domains with posterodorsal-anteroventral polarity in the symmetrical sensory maps of the mouse olfactory bulb : mapping of odourant-induced zif268 expression. *Eur J Neurosci* 15(10), 1563–74.
- Isaacson, J. S. and B. W. Strowbridge (1998, Apr). Olfactory reciprocal synapses : dendritic signaling in the cns. *Neuron* 20(4), 749–61.
- Isaacson, J. S. and H. Vitten (2003, Mar). Gaba(b) receptors inhibit dendrodendritic transmission in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 23(6), 2032–9.
- Jacobson, I., S. Butcher, and A. Hamberger (1986, Sep). An analysis of the effects of excitatory amino acid receptor antagonists on evoked field potentials in the olfactory bulb. *Neuroscience* 19(1), 267–73.
- John, E. R. (1972, Sep). Switchboard versus statistical theories of learning and memory. *Science* 177(52), 850–64.
- Johnson, B. A., H. Farahbod, and M. Leon (2005, Mar). Interactions between odorant functional group and hydrocarbon structure influence activity in glomerular response modules in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 483(2), 205–16.
- Johnson, B. A., H. Farahbod, S. Saber, and M. Leon (2005, Mar). Effects of functional group position on spatial representations of aliphatic odorants in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 483(2), 192–204.
- Johnson, B. A., S. L. Ho, Z. Xu, J. S. Yihan, S. Yip, E. E. Hingco, and M. Leon (2002, Jul). Functional mapping of the rat olfactory bulb using diverse odorants reveals modular responses to functional groups and hydrocarbon structural features. *J Comp Neurol* 449(2), 180–94.
- Johnson, B. A., C. C. Woo, and M. Leon (1998, Apr). Spatial coding of odorant features in the glomerular layer of the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 393(4), 457–71.
- Jourdan, F., A. Duveau, L. Astic, and A. Holley (1980, Apr). Spatial distribution of (14c)2-deoxyglucose uptake in the olfactory bulbs of rats stimulated with two different odours. *Brain Res* 188(1), 139–54.

- Kamisaki, Y., K. Wada, K. Nakamoto, and T. Itoh (1996). Release of taurine and its effects on release of neurotransmitter amino acids in rat cerebral cortex. *Adv Exp Med Biol* 403, 445–54.
- Kane, A., W. D. Hutchison, M. Hodaie, A. M. Lozano, and J. O. Dostrovsky (2009, Feb). Enhanced synchronization of thalamic theta band local field potentials in patients with essential tremor. *Exp Neurol*.
- Kashiwadani, H., Y. F. Sasaki, N. Uchida, and K. Mori (1999, Oct). Synchronized oscillatory discharges of mitral/tufted cells with different molecular receptive ranges in the rabbit olfactory bulb. *J Neurophysiol* 82(4), 1786–92.
- Kato, K., H. Koshimoto, A. Tani, and K. Mori (1993, Nov). Coding of odor molecules by mitral/tufted cells in rabbit olfactory bulb. ii. aromatic compounds. *J Neurophysiol* 70(5), 2161–75.
- Kauer, J. S. (1974, Dec). Response patterns of amphibian olfactory bulb neurones to odour stimulation. *J Physiol* 243(3), 695–715.
- Kauer, J. S. (1991, Feb). Contributions of topography and parallel processing to odor coding in the vertebrate olfactory pathway. *Trends Neurosci* 14(2), 79–85.
- Kauer, J. S. and A. R. Cinelli (1993, Feb). Are there structural and functional modules in the vertebrate olfactory bulb? *Microsc Res Tech* 24(2), 157–67.
- Kauer, J. S. and G. M. Shepherd (1977, Nov). Analysis of the onset phase of olfactory bulb unit responses to odour pulses in the salamander. *J Physiol* 272(2), 495–516.
- Kevetter, G. A. and S. S. Winans (1981, Mar). Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. ii. efferents of the "olfactory amygdala". *J Comp Neurol* 197(1), 99–111.
- Kinzie, J. M., J. A. Saugstad, G. L. Westbrook, and T. P. Segerson (1995, Nov). Distribution of metabotropic glutamate receptor 7 messenger rna in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 69(1), 167–76.
- Lagier, S., A. Carleton, and P. M. Lledo (2004). Interplay between local gabaergic interneurons and relay neurons generates gamma oscillations in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 24, 4382–92. t.

- Laurent, G. (2002, Nov). Olfactory network dynamics and the coding of multidimensional signals. *Nat Rev Neurosci* 3(11), 884–95.
- Laurent, G. and H. Davidowitz (1994, Sep). Encoding of olfactory information with oscillating neural assemblies. *Science* 265(5180), 1872–1875.
- Laurent, G., M. Wehr, and H. Davidowitz (1996, Jun). Temporal representations of odors in an olfactory network. *J Neurosci* 16(12), 3837–47.
- Laurie, D. J., P. H. Seeburg, and W. Wisden (1992, Mar). The distribution of 13 gamma receptor subunit mRNAs in the rat brain. ii. olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci* 12(3), 1063–76.
- Levy, N. S., H. A. Bakalyar, and R. R. Reed (1991, Oct). Signal transduction in olfactory neurons. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39(4B), 633–7.
- Lieke, E. E., R. D. Frostig, A. Arieli, D. Y. Ts'ao, R. Hildesheim, and A. Grinvald (1989). Optical imaging of cortical activity : real-time imaging using extrinsic dye-signals and high resolution imaging based on slow intrinsic-signals. *Annu Rev Physiol* 51, 543–59.
- Litaudon, P., S. Garcia, and N. Buonviso (2008, Oct). Strong coupling between pyramidal cell activity and network oscillations in the olfactory cortex. *Neuroscience* 156(3), 781–7.
- Liu, C. J., P. Grandes, C. Matute, M. Cuénod, and P. Streit (1989). Glutamate-like immunoreactivity revealed in rat olfactory bulb, hippocampus and cerebellum by monoclonal antibody and sensitive staining method. *Histochemistry* 90(6), 427–45.
- Lledo, P.-M., M. Alonso, and M. S. Grubb (2006, Mar). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7(3), 179–93.
- Llinás, R. R., A. A. Grace, and Y. Yarom (1991, Feb). In vitro neurons in mammalian cortical layer 4 exhibit intrinsic oscillatory activity in the 10- to 50-hz frequency range. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(3), 897–901.
- Lowe, G. (2002, Jul). Inhibition of backpropagating action potentials in mitral cell secondary dendrites. *J Neurophysiol* 88(1), 64–85.
- Lu, X. C. and B. M. Slotnick (1998, Jun). Olfaction in rats with extensive lesions of the olfactory bulbs : implications for odor coding. *Neuroscience* 84(3), 849–66.

- Luce, R. D. (1986). *Response Times*. Oxford : Oxford University Press.
- Lund, R. D. (1969, Feb). Synaptic patterns of the superficial layers of the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 135(2), 179–208.
- Luo, M. and L. C. Katz (2001, Dec). Response correlation maps of neurons in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 32(6), 1165–79.
- MacLeod, K. and G. Laurent (1996, Nov). Distinct mechanisms for synchronization and temporal patterning of odor-encoding neural assemblies. *Science* 274(5289), 976–9.
- MacLeod, N. K. (1976, Jun). Spontaneous activity of single neurons in the olfactory bulb of the rainbow trout (*salmo gairdneri*) and its modulation by olfactory stimulation with amino acids. *Exp Brain Res* 25(3), 267–78.
- MacLeod, N. K. and G. A. Lowe (1976, Jun). Field potentials in the olfactory bulb of the rainbow trout (*salmo gairdneri*) : evidence for a dendrodendritic inhibitory pathway. *Exp Brain Res* 25(3), 255–66.
- Macrides, F. and S. L. Chorover (1972, Jan). Olfactory bulb units : activity correlated with inhalation cycles and odor quality. *Science* 175(17), 84–7.
- Macrides, F., H. B. Eichenbaum, and W. B. Forbes (1982, Dec). Temporal relationship between sniffing and the limbic theta rhythm during odor discrimination reversal learning. *J Neurosci* 2(12), 1705–17.
- Malnic, B., J. Hirono, T. Sato, and L. B. Buck (1999, Mar). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96(5), 713–23.
- Margrie, T. W., B. Sakmann, and N. N. Urban (2001, Jan). Action potential propagation in mitral cell lateral dendrites is decremental and controls recurrent and lateral inhibition in the mammalian olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(1), 319–24.
- Margrie, T. W. and A. T. Schaefer (2003, Jan). Theta oscillation coupled spike latencies yield computational vigour in a mammalian sensory system. *J Physiol* 546(Pt 2), 363–74.
- Martin, C., R. Gervais, E. Hugues, B. Messaoudi, and N. Ravel (2004). Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb : a correlate of odor recognition ? *J Neurosci* 24, 389–97. Journal Article.

- Martin, C., R. Gervais, B. Messaoudi, and N. Ravel (2006, Apr). Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition : a network activity. *Eur J Neurosci* 23(7), 1801–10.
- Martin, L. J., C. D. Blackstone, A. I. Levey, R. L. Huganir, and D. L. Price (1993, Mar). Ampa glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53(2), 327–58.
- Martinez, D. and N. Montejo (2008). A model of stimulus-specific neural assemblies in the insect antennal lobe. *PLoS Comput Biol* 4(8), e1000139.
- Meisami, E. (1989, Mar). A proposed relationship between increases in the number of olfactory receptor neurons, convergence ratio and sensitivity in the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res* 46(1), 9–19.
- Meisami, E. and L. Safari (1981, Sep). 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(1), 81–107.
- Meredith, M. (1986, Sep). Patterned response to odor in mammalian olfactory bulb : the influence of intensity. *J Neurophysiol* 56(3), 572–97.
- Middleton, S. J., C. Racca, M. O. Cunningham, R. D. Traub, H. Monyer, T. Knöpfel, I. S. Schofield, A. Jenkins, and M. A. Whittington (2008, Jun). High-frequency network oscillations in cerebellar cortex. *Neuron* 58(5), 763–74.
- Molnár, E., A. Baude, S. A. Richmond, P. B. Patel, P. Somogyi, and R. A. McIlhinney (1993, Mar). Biochemical and immunocytochemical characterization of anti-peptide antibodies to a cloned glur1 glutamate receptor subunit : cellular and subcellular distribution in the rat forebrain. *Neuroscience* 53(2), 307–26.
- Mombaerts, P., F. Wang, C. Dulac, S. K. Chao, A. Nemes, M. Mendelsohn, J. Edmondson, and R. Axel (1996, Nov). Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87(4), 675–86.
- Monaghan, D. T. and C. W. Cotman (1982, Dec). The distribution of (3h)kainic acid binding sites in rat cns as determined by autoradiography. *Brain Res* 252(1), 91–100.
- Montague, A. A. and C. A. Greer (1999, Mar). Differential distribution of ionotropic glutamate receptor subunits in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 405(2), 233–46.

- Monyer, H., N. Burnashev, D. J. Laurie, B. Sakmann, and P. H. Seeburg (1994, Mar). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four nmda receptors. *Neuron* 12(3), 529–40.
- Mori, K. (1995, Aug). Relation of chemical structure to specificity of response in olfactory glomeruli. *Curr Opin Neurobiol* 5(4), 467–74.
- Mori, K., S. Kogure, and S. Takagi (1977, Sep). Alternating responses of olfactory bulb neurons to repetitive lateral olfactory tract stimulation. *Brain Res* 133(1), 150–5.
- Mori, K., M. Satou, and S. F. Takagi (1979, May). Axonal projection of anterior olfactory nuclear neurons to the olfactory bulb bilaterally. *Exp Neurol* 64(2), 295–305.
- Moulton, D. G. and L. M. Beidler (1967, Jan). Structure and function in the peripheral olfactory system. *Physiol Rev* 47(1), 1–52.
- Mozell, M. M. (1964, Sep). Evidence for sorption as a mechanism of the olfactory analysis of vapours. *Nature* 203, 1181–2.
- Mozell, M. M. (1970, Jul). Evidence for a chromatographic model of olfaction. *J Gen Physiol* 56(1), 46–63.
- Mozell, M. M. and M. Jagodowicz (1973, Sep). Chromatographic separation of odorants by the nose : retention times measured across in vivo olfactory mucosa. *Science* 181(106), 1247–9.
- Murthy, V. N. and E. E. Fetz (1996a, Dec). Oscillatory activity in sensorimotor cortex of awake monkeys : synchronization of local field potentials and relation to behavior. *J Neurophysiol* 76(6), 3949–67.
- Murthy, V. N. and E. E. Fetz (1996b, Dec). Synchronization of neurons during local field potential oscillations in sensorimotor cortex of awake monkeys. *J Neurophysiol* 76(6), 3968–82.
- Nef, P., I. Hermans-Borgmeyer, H. Artières-Pin, L. Beasley, V. E. Dionne, and S. F. Heinemann (1992, Oct). Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(19), 8948–52.
- Neuenschwander, S., M. Castelo-Branco, J. Baron, and W. Singer (2002, Dec). Feed-forward synchronization : propagation of temporal patterns along the retinorecortical pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357(1428), 1869–76.

- Neville, K. R. and L. B. Haberly (2003). Beta and gamma oscillations in the olfactory system of the urethane-anesthetized rat. *J Neurophysiol* 90, 3921–30. †, P.H.S.
- Newman, R. and S. S. Winans (1980, May). An experimental study of the ventral striatum of the golden hamster. ii. neuronal connections of the olfactory tubercle. *J Comp Neurol* 191(2), 193–212.
- Ngai, J., A. Chess, M. M. Dowling, N. Neches, E. R. Macagno, and R. Axel (1993, Mar). Coding of olfactory information : topography of odorant receptor expression in the catfish olfactory epithelium. *Cell* 72(5), 667–80.
- Ngai, J., M. M. Dowling, L. Buck, R. Axel, and A. Chess (1993, Mar). The family of genes encoding odorant receptors in the channel catfish. *Cell* 72(5), 657–66.
- Nicoll, R. A. (1971, Dec). Pharmacological evidence for gaba as the transmitter in granule cell inhibition in the olfactory bulb. *Brain Res* 35(1), 137–49.
- Nissant, A., C. Bardy, H. Katagiri, K. Murray, and P-M. Lledo (2009, May). Adult neurogenesis promotes synaptic plasticity in the olfactory bulb. *Nat Neurosci*.
- Nusser, Z., L. M. Kay, G. Laurent, G. E. Homanics, and I. Mody (2001, Dec). Disruption of gaba(a) receptors on gabaergic interneurons leads to increased oscillatory power in the olfactory bulb network. *J Neurophysiol* 86(6), 2823–33.
- Onoda, N. and K. Mori (1980, Jul). Depth distribution of temporal firing patterns in olfactory bulb related to air-intake cycles. *J Neurophysiol* 44(1), 29–39.
- Orona, E., E. C. Rainer, and J. W. Scott (1984, Jul). Dendritic and axonal organization of mitral and tufted cells in the rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 226(3), 346–56.
- Orona, E., J. W. Scott, and E. C. Rainer (1983, Jun). Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb. *J Comp Neurol* 217(2), 227–37.
- Pager, J. (1981, Dec). (respiratory modulation of unit activity in the olfactory bulb of tracheotomized rats). *C R Seances Acad Sci III* 293(15), 835–8.
- Pager, J. (1985, Aug). Respiration and olfactory bulb unit activity in the unrestrained rat : statements and reappraisals. *Behav Brain Res* 16(2-3), 81–94.
- Palacios, J. M., J. K. Wamsley, and M. J. Kuhar (1981, Oct). High affinity gaba receptors-autoradiographic localization. *Brain Res* 222(2), 285–307.

- Panzanelli, P., A.-Z. Perazzini, J.-M. Fritschy, and M. Sassoè-Pognetto (2005, Mar). Heterogeneity of gamma-aminobutyric acid type a receptors in mitral and tufted cells of the rat main olfactory bulb. *J Comp Neurol* 484(1), 121–31.
- Parmentier, M., F. Libert, S. Schurmans, S. Schiffmann, A. Lefort, D. Eggerickx, C. Ledent, C. Mollereau, C. Gérard, J. Perret, and et al. (1992, Jan). Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature* 355(6359), 453–5.
- Pepçu, G. and P. Blandina (1998, Oct-Dec). The acetylcholine, gaba, glutamate triangle in the rat forebrain. *J Physiol Paris* 92(5-6), 351–5.
- Perez-Orive, J., M. Bazhenov, and G. Laurent (2004, Jun). Intrinsic and circuit properties favor coincidence detection for decoding oscillatory input. *J Neurosci* 24(26), 6037–47.
- Perez-Orive, J., O. Mazor, G. C. Turner, S. Cassenaer, R. I. Wilson, and G. Laurent (2002, Jul). Oscillations and sparsening of odor representations in the mushroom body. *Science* 297(5580), 359–65.
- Pesaran, B., J. S. Pezaris, M. Sahani, P. P. Mitra, and R. A. Andersen (2002, Aug). Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex. *Nat Neurosci* 5(8), 805–11.
- Petralia, R. S. and R. J. Wenthold (1992, Apr). Light and electron immunocytochemical localization of ampa-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol* 318(3), 329–54.
- Petralia, R. S., N. Yokotani, and R. J. Wenthold (1994, Feb). Light and electron microscope distribution of the nmda receptor subunit nmdar1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci* 14(2), 667–96.
- Pouget, A., P. Dayan, and R. Zemel (2000, Nov). Information processing with population codes. *Nat Rev Neurosci* 1(2), 125–32.
- Price, J. L. and T. P. Powell (1970a, Nov). The mitral and short axon cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7(3), 631–51.
- Price, J. L. and T. P. Powell (1970b, Jul). The morphology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7(1), 91–123.

- Price, J. L. and T. P. Powell (1970c, Jul). The synaptology of the granule cells of the olfactory bulb. *J Cell Sci* 7(1), 125–55.
- Price, J. L. and T. P. Powell (1971, Oct). Certain observations on the olfactory pathway. *J Anat* 110(Pt 1), 105–26.
- Rall, W. and G. M. Shepherd (1968, Nov). Theoretical reconstruction of field potentials and dendrodendritic synaptic interactions in olfactory bulb. *J Neurophysiol* 31(6), 884–915.
- Rall, W., G. M. Shepherd, T. S. Reese, and M. W. Brightman (1966, Jan). Dendrodendritic synaptic pathway for inhibition in the olfactory bulb. *Exp Neurol* 14(1), 44–56.
- Ravel, N., D. Caille, and J. Pager (1987). A centrifugal respiratory modulation of olfactory bulb unit activity : a study on acute rat preparation. *Exp Brain Res* 65(3), 623–8.
- Ravel, N., P. Chabaud, C. Martin, V. Gaveau, E. Hugues, C. Tallon-Baudry, O. Bertrand, and R. Gervais (2003, Jan). Olfactory learning modifies the expression of odour-induced oscillatory responses in the gamma (60-90 hz) and beta (15-40 hz) bands in the rat olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 17(2), 350–8.
- Ravel, N. and J. Pager (1990, Jul). Respiratory patterning of the rat olfactory bulb unit activity : nasal versus tracheal breathing. *Neurosci Lett* 115(2-3), 213–8.
- Ressler, K. J., S. L. Sullivan, and L. B. Buck (1993, May). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* 73(3), 597–609.
- Rinberg, D., A. Koulakov, and A. Gelperin (2006, Aug). Sparse odor coding in awake behaving mice. *J Neurosci* 26(34), 8857–65.
- Romano, C., M. A. Sesma, C. T. McDonald, K. O'Malley, A. N. Van den Pol, and J. W. Olney (1995, May). Distribution of metabotropic glutamate receptor mglur5 immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 355(3), 455–69.
- Royet, J. P., H. Distel, R. Hudson, and R. Gervais (1998, Mar). A re-estimation of the number of glomeruli and mitral cells in the olfactory bulb of rabbit. *Brain Res* 788(1-2), 35–42.

- Royet, J. P., C. Souchier, F. Jourdan, and H. Ploye (1988, Apr). Morphometric study of the glomerular population in the mouse olfactory bulb : numerical density and size distribution along the rostrocaudal axis. *J Comp Neurol* 270(4), 559–68.
- Rubin, B. D. and L. C. Katz (1999, Jul). Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 23(3), 499–511.
- Sallaz, M. and F. Jourdan (1996, May). Odour-induced c-fos expression in the rat olfactory bulb : involvement of centrifugal afferents. *Brain Res* 721(1-2), 66–75.
- Sarnthein, J. and D. Jeanmonod (2008, Feb). High thalamocortical theta coherence in patients with neurogenic pain. *Neuroimage* 39(4), 1910–7.
- Sassoè-Pognetto, M., D. Cantino, P. Panzanelli, L. Verdun di Cantogno, M. Giustetto, F. L. Margolis, S. De Biasi, and A. Fasolo (1993, Oct). Presynaptic co-localization of carnosine and glutamate in olfactory neurones. *Neuroreport* 5(1), 7–10.
- Sassoè-Pognetto, M. and O. P. Ottersen (2000, Mar). Organization of ionotropic glutamate receptors at dendrodendritic synapses in the rat olfactory bulb. *J Neurosci* 20(6), 2192–201.
- Saucier, D. and L. Astic (1986, Apr). Analysis of the topographical organization of olfactory epithelium projections in the rat. *Brain Res Bull* 16(4), 455–62.
- Schaefer, A. T., K. Angelo, H. Spors, and T. W. Margrie (2006, Jun). Neuronal oscillations enhance stimulus discrimination by ensuring action potential precision. *PLoS Biol* 4(6), e163.
- Schneider, S. P. and F. Macrides (1978, Jan-Feb). Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster. *Brain Res Bull* 3(1), 73–82.
- Schoppa, N. E. and G. L. Westbrook (2001, Aug). Glomerulus-specific synchronization of mitral cells in the olfactory bulb. *Neuron* 31(4), 639–51.
- Scott, J. W. (1981, Nov). Electrophysiological identification of mitral and tufted cells and distributions of their axons in olfactory system of the rat. *J Neurophysiol* 46(5), 918–31.
- Scott, J. W., H. P. Acevedo, and L. Sherrill (2006, Jul). Effects of concentration and sniff flow rate on the rat electroolfactogram. *Chem Senses* 31(6), 581–93.

- Scott, J. W., R. L. McBride, and S. P. Schneider (1980, Dec). The organization of projections from the olfactory bulb to the piriform cortex and olfactory tubercle in the rat. *J Comp Neurol* 194(3), 519–34.
- Serizawa, S., T. Ishii, H. Nakatani, A. Tsuboi, F. Nagawa, M. Asano, K. Sudo, J. Sakagami, H. Sakano, T. Ijiri, Y. Matsuda, M. Suzuki, T. Yamamori, Y. Iwakura, and H. Sakano (2000, Jul). Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nat Neurosci* 3(7), 687–93.
- Shepherd, G. M. (1971, Sep). Physiological evidence for dendrodendritic synaptic interactions in the rabbit's olfactory glomerulus. *Brain Res* 32(1), 212–7.
- Shepherd, G. M. (1972a, Dec). The neuron doctrine : a revision of functional concepts. *Yale J Biol Med* 45(6), 584–99.
- Shepherd, G. M. (1972b, Oct). Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiol Rev* 52(4), 864–917.
- Shiple, M. T. and G. D. Adamek (1984, Jun). The connections of the mouse olfactory bulb : a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Res Bull* 12(6), 669–88.
- Shiple, M. T., F. J. Halloran, and J. de la Torre (1985, Mar). Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* 329(1-2), 294–9.
- Shiple, m. t., j. h. McLean, l. a. Zimmer, and m. Ennis (1996). Chapter The olfactory system, pp. 469–575. Elsevier, New York.
- Silva, L. R., Y. Amitai, and B. W. Connors (1991, Jan). Intrinsic oscillations of neocortex generated by layer 5 pyramidal neurons. *Science* 251(4992), 432–5.
- Singer, W. and C. M. Gray (1995). Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. *Annu Rev Neurosci* 18, 555–86.
- Sloper, J. J. (1971, Nov). Dendro-dendritic synapses in the primate motor cortex. *Brain Res* 34(1), 186–92.
- Slotnick, B. M., G. A. Bell, H. Panhuber, and D. G. Laing (1997, Jul). Detection and discrimination of propionic acid after removal of its 2-dg identified major focus in the olfactory bulb : a psychophysical analysis. *Brain Res* 762(1-2), 89–96.

- Sobel, E. C. and D. W. Tank (1993, Apr). Timing of odor stimulation does not alter patterning of olfactory bulb unit activity in freely breathing rats. *J Neurophysiol* 69(4), 1331–7.
- Sokoloff, L., M. Reivich, C. Kennedy, M. H. Des Rosiers, C. S. Patlak, K. D. Pettigrew, O. Sakurada, and M. Shinohara (1977, May). The (14c)deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization : theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* 28(5), 897–916.
- Spors, H. and A. Grinvald (2002, Apr). Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 34(2), 301–15.
- Spors, H., M. Wachowiak, L. B. Cohen, and R. W. Friedrich (2006, Jan). Temporal dynamics and latency patterns of receptor neuron input to the olfactory bulb. *J Neurosci* 26(4), 1247–59.
- Sterling, P. (1971). Receptive fields and synaptic organization of the superficial gray layer of the cat superior colliculus. *Vision Res Suppl* 3, 309–28.
- Stopfer, M., S. Bhagavan, B. H. Smith, and G. Laurent (1997). Impaired odour discrimination on desynchronization of odour-encoding neural assemblies. *Nature* 390, 70–4. †, P.H.S.
- Stopfer, M. and G. Laurent (1999, Dec). Short-term memory in olfactory network dynamics. *Nature* 402(6762), 664–8.
- Strotmann, J., I. Wanner, T. Helfrich, A. Beck, and H. Breer (1994, Oct). Rostro-caudal patterning of receptor-expressing olfactory neurones in the rat nasal cavity. *Cell Tissue Res* 278(1), 11–20.
- Tabor, R., E. Yaksi, and R. W. Friedrich (2008, Jul). Multiple functions of gaba a and gaba b receptors during pattern processing in the zebrafish olfactory bulb. *Eur J Neurosci* 28(1), 117–27.
- Trombley, P. Q. and G. M. Shepherd (1994, Feb). Glycine exerts potent inhibitory actions on mammalian olfactory bulb neurons. *J Neurophysiol* 71(2), 761–7.
- Trombley, P. Q. and G. L. Westbrook (1990, Aug). Excitatory synaptic transmission in cultures of rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 64(2), 598–606.

- Tsuno, Y., H. Kashiwadani, and K. Mori (2008, Sep). Behavioral state regulation of dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *J Neurosci* 28(37), 9227–38.
- Uchida, N. and Z. F. Mainen (2003). Speed and accuracy of olfactory discrimination in the rat. *Nat Neurosci* 6, 1224–9. t, P.H.S.
- Uchida, N., Y. K. Takahashi, M. Tanifuji, and K. Mori (2000, Oct). Odor maps in the mammalian olfactory bulb : domain organization and odorant structural features. *Nat Neurosci* 3(10), 1035–43.
- van den Pol, A. N. (1995, Aug). Presynaptic metabotropic glutamate receptors in adult and developing neurons : autoexcitation in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 359(2), 253–71.
- Vassar, R., S. K. Chao, R. Sitcheran, J. M. Nuñez, L. B. Vosshall, and R. Axel (1994, Dec). Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell* 79(6), 981–91.
- Vassar, R., J. Ngai, and R. Axel (1993, Jul). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* 74(2), 309–18.
- Verhagen, J. V., D. W. Wesson, T. I. Netoff, J. A. White, and M. Wachowiak (2007). Sniffing controls an adaptive filter of sensory input to the olfactory bulb. *Nat Neurosci* 10, 631–9. t.
- Viana Di Prisco, G. and W. J. Freeman (1985, Oct). Odor-related bulbar eeg spatial pattern analysis during appetitive conditioning in rabbits. *Behav Neurosci* 99(5), 964–78.
- Von der Marlsburg, C. (1981). The correlation theory of brain function. *Internal report, Abteilung für Neurobiologie, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen* 81-2.
- Watanabe, M., Y. Inoue, K. Sakimura, and M. Mishina (1993, Dec). Distinct distributions of five n-methyl-d-aspartate receptor channel subunit mrnas in the fore-brain. *J Comp Neurol* 338(3), 377–90.
- Wehr, M. and G. Laurent (1996, Nov). Odour encoding by temporal sequences of firing in oscillating neural assemblies. *Nature* 384(6605), 162–6.

- Wesson, D. W., R. M. Carey, J. V. Verhagen, and M. Wachowiak (2008, Apr). Rapid encoding and perception of novel odors in the rat. *PLoS Biol* 6(4), e82.
- Wesson, D. W., T. N. Donahou, M. O. Johnson, and M. Wachowiak (2008, Sep). Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem Senses* 33(7), 581–96.
- Whittington, M. A., R. D. Traub, and J. G. Jefferys (1995, Feb). Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* 373(6515), 612–5.
- Willhite, D. C., K. T. Nguyen, A. V. Masurkar, C. A. Greer, G. M. Shepherd, and W. R. Chen (2006, Aug). Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(33), 12592–7.
- Yokoi, M., K. Mori, and S. Nakanishi (1995, Apr). Refinement of odor molecule tuning by dendrodendritic synaptic inhibition in the olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(8), 3371–5.
- Youngentob, S. L., M. M. Mozell, P. R. Sheehe, and D. E. Hornung (1987). A quantitative analysis of sniffing strategies in rats performing odor detection tasks. *Physiol Behav* 41(1), 59–69.
- Zhao, H., L. Ivic, J. M. Otaki, M. Hashimoto, K. Mikoshiba, and S. Firestein (1998, Jan). Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* 279(5348), 237–42.