HAL
open science

Mise en évidence de transporteurs de la résistance pléiotropique dans la muqueuse olfactive et leur implication dans la réponse aux odorants chez les rongeurs

Adrien Molinas

To cite this version:

Adrien Molinas. Mise en évidence de transporteurs de la résistance pléiotropique dans la muqueuse olfactive et leur implication dans la réponse aux odorants chez les rongeurs. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS089 . tel-00763536

HAL Id: tel-00763536

https://theses.hal.science/tel-00763536v1

Submitted on 11 Dec 2012

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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation
UMR 6265 CNRS, 1324 INRA-Ub

THÈSE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne

Spécialité : **Sciences de la vie**
Option : **Neurosciences**

Par **Adrien MOLINAS**

Soutenue le 09 décembre 2011

Mise en évidence de transporteurs de la résistance pléiotropique dans la muqueuse olfactive et leur implication dans la réponse aux odorants chez les rongeurs

Directeur de thèse : **Mr Gilles SICARD**
Co-directrice de thèse : **Mme Ingrid JAKOB**

Composition du jury:

Mr Gérard BRAND	Rapporteur
Mr Frank THEVENOD	Rapporteur
Mr Yves ARTUR	Examinateur
Mr Jean-Marie HEYDEL	Examinateur
Mr François ROMAN	Examinateur
Mr Laurent TAVERNIER	Examinateur

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC	ATP Binding Cassette
AC III	Adénylate cyclase de type 3
AM	Acetoxymethyl
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ATP	Adénosine TriPhosphate
CNG	Canal cationique aspécifique couplé aux nucléotides cycliques
DMSO	Diméthylsulfoxide
EOG	Electro-olfactogramme
GMPc	Guanosine MonoPhosphate cyclique
IBMX	3 Isobutyl-1-methylxanthine
Mdr1	Multidrug resistance protein
Mrp1	Multidrug resistance-associated protein
OMP	Olfactory marker protein
PCR	Polymerase chain reaction
ROI	Région d’intérêt
RT-PCR	Retro-Transcription Polymerase chain reaction
Vmax	Voltage maximum

REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner ma plus grande reconnaissance à Ingrid Jakob qui avec sa disponibilité sans faille, ses connaissances et son savoir-faire inestimables, a largement contribué au bon déroulement et surtout à l'aboutissement de cette thèse.

Je remercie Gilles Sicard pour m'avoir intégré à son équipe et pour avoir mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à la réalisation de mon travail. Je le remercie également pour son soutien et ses conseils tout au long de ma thèse.

Je remercie la Fondation Edmond Roudnitska qui en m'accordant une bourse m'a permis de me consacrer de façon optimale à mes travaux.

Je remercie Benoist Shaal qui en tant que directeur du CESG m'a accueilli avec bienveillance dans ses locaux. Je remercie également Luc Pénicaud qui en tant qu'actuel directeur du CSGA m'a permis de mener cette thèse jusqu'à son terme.

Je remercie mon comité de suivi de thèse, Jacques Durand et Philippe Litaudon.

Tout au long de cette thèse j'ai reçu de l'aide, du soutien et des conseils aussi bien de la part d'étudiants que de chercheurs/ ingénieurs/ techniciens aguerris, je les remercie tous. Parmi ceux-ci je tiens à remercier particulièrement Claire Fenech, Xavier Grosmaitre, Hervé Cadiou, Imad Aoude, Stéphanie Véloso et Volkert Breuninger.

Je remercie Anne Lefranc à l'animalerie, Cédric Serrano et Michel Tavan aux services techniques, Véronique Bué, Christine Chabert et Sabine Duchesne au secrétariat qui durant mon séjour au Centre des Sciences du Goût ont toujours été disponibles et ont toujours su être accommodants.

L'accomplissement de cette thèse sur la durée a été rendu beaucoup plus supportable grâce à la contribution de mes proches. Ainsi, je voue une admiration sans fin à Ambre qui parmi de nombreux sacrifices a tout quitté dans le Var pour venir prendre soin de moi à Dijon. Je l'admire aussi pour avoir réussi à me supporter durant ces quelques années ainsi que pour son réconfort indéfectible. Je tiens à remercier également ma famille, Annie, Philippe, Delphine, Adeline, Guillaume et Gérald pour leur soutien et leur aide en tout instant. Sans oublier les grands-mères, tantes, oncles, cousins et cousines qui m'ont adressé leurs pensées.

Finalement je tiens à remercier les copains et copines du Judo Club Dijonnais pour leur amitié chaleureuse aussi bien sur les tatamis qu'autour d'un canon. Ces moments partagés avec eux ont été particulièrement appréciables durant les périodes les plus difficiles.

Je transmets une fois de plus à toutes ces personnes un grand Merci.

RESUME

La résistance pléiotropique est une propriété qui permet à certaines cellules de pouvoir rejeter une très large variété de substances endogènes ou exogènes potentiellement toxiques. Cette résistance implique des transporteurs de la superfamille ABC et plus particulièrement P-gp et Mrp1. Le fait de bloquer ces transporteurs permet dans certains cas d'améliorer le marquage de tissus avec des sondes fluorescentes. A partir de tranches coronales de la cavité nasale de rats et de souris nouveau-nés nous avons montré une augmentation de l'accumulation d'une sonde fluoresccente, la calcéine, dans l'épithélium olfactif en présence de bloqueurs spécifiques de P-gp et de Mrp1. Comme l'épithélium olfactif a principalement une fonction sensorielle nous avons testé les effets des bloqueurs utilisés précédemment sur la réponse olfactive. En enregistrant des électro-olfactogrammes en phase aqueuse chez la souris et le rat adulte nous avons découvert que les bloqueurs de Mrp1 diminuent fortement l'amplitude des réponses olfactives. Par RT-PCR nous avons mis en évidence l'expression de P-gp et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif de souris et de rats adultes et nouveau-nés. Ces protéines sont exprimées et fonctionnelles dans les neurones olfactifs et les cellules de soutien. Le rôle de Mrp1 dans la réponse olfactive reste à déterminer.

Mots clés : Epithélium olfactif, Electro-olfactogramme, Résistance pléiotropique, calcéine, Rongeurs.

ABSTRACT

Multidrug resistance (MDR) is a property of various cells associated with the capacity to reject or efflux a wide range of potentially harmful substances out of the cell. Pumps that effect such efflux are membrane proteins and belong to the ATP- binding cassette (ABC) superfamily. Among the members of the ABC family two are conferring MDR, P-glycoprotein (Pgp) and the multidrug resistance-associated protein (MRP1). In this study we investigated the functional activity of MDR transporters in olfactory mucosa of two species, rat and mouse. We used the fluorometric calcein-AM uptake assay on olfactory mucosal slices incubated with specific inhibitors of the MDR-transporters, verapamil and cyclosporin A as Pgp-inhibitors, and probenecid and MK571 as MRP-inhibitors. All four inhibitors caused significant increases in fluorescence intensities. To test if MDR transporters may be involved in the olfactory response we examined odorant evoked responses to single and mixed odorants by means of electro-olfactograms recordings (EOG). In the presence of the two MRP inhibitors, maximum EOG amplitudes were significantly reduced for all odorants tested, while Pgp inhibitors had only a moderate or no effect. Expression of Pgp and MRP1 encoding genes in the olfactory epithelium was further confirmed by RT-PCR.The results together suggest that MRP and Pgp transporters are present and functional in the main olfactory epithelium of rodents and are implicated in the olfactory response. The precise functional role in olfaction remains to be elucidated.

Keywords: Olfactory epithelium, Electro-olfactogram, Multidrug resistance, Calcein, Rodents.

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION ---------- 1

A. Physiologie de l'olfaction ---------- 3
1. Anatomie du système olfactif ---------- 3
2. Organisation du système olfactif ---------- 4
   a) L'organe olfactif principal ---------- 5
   b) L'organe voméronasal ---------- 5
   c) L'organe septal de Masera ---------- 6
   d) Le ganglion de Grueneberg ---------- 6
3. Organisation de l'épithélium olfactif principal ---------- 6
   a) Neurones sensoriels olfactifs ---------- 8
   b) Cellules de soutien ---------- 10
   c) Cellules basales ---------- 11
   d) Cellules à microvillosités ---------- 11
4. Transduction du signal sensoriel ---------- 11
   a) Nature des stimuli olfactifs ---------- 11
   b) Acheminement des stimuli olfactifs ---------- 12
   c) Voie de transduction impliquant l'AMPc ---------- 12
   d) Voie de transduction impliquant la phospholipase C ---------- 13
   e) Voie de transduction impliquant la GMPc ---------- 14
5. De la périphérie au système nerveux central ---------- 15
   a) Organisation du bulbe olfactif ---------- 15
   b) Transmission de l'information olfactive à travers le bulbe olfactif ---------- 17

B. Méthodes d'exploration de la muqueuse olfactive ---------- 18
1. Enregistrements de l'activité d'une population de neurones ---------- 18
   a) Electro-olfactogrammes ---------- 18
2. Enregistrements électrophysiologiques unitaires ---------- 21
   a) Enregistrements extracellulaires ---------- 21
   b) Enregistrements intracellulaires ---------- 21
3. Enregistrements optiques dépendants du potentiel ---------- 22

C. Détoxication cellulaire ---------- 22
1. Principe ---------- 23
   a) Phase I ---------- 23
   b) Phase II ---------- 24
   c) Phase III ---------- 24

D. La résistance pléiotropique ---------- 25
1. Principe ---------- 25
2. Famille des transporteurs ABC ---------- 25
3. Transporteurs impliqués dans la résistance pléiotropique ---------- 26
4. P-gp/MDR1 ---------- 27
   a) Découverte ---------- 27
   b) Propriétés du transporteur ---------- 27
   c) Localisation et rôle physiologique ---------- 28
5. Mrp1 ---------- 30
   a) Découverte ---------- 30
   b) Propriétés du transporteur ---------- 30
   c) Localisation et rôle physiologique ---------- 31
6. Expression de MDR1 et de MRP1 dans le tissu olfactif ---------- 32
7. Modulateurs du transport effectué par MDR1 et MRP1 ---------- 34
   a) Modulateurs spécifiques de MDR1 ---------- 35

b) Modulateurs spécifiques de MRP1 ---------- 35

E. Techniques d'étude de MDR1 et de MRP1 ---------- 36
1. Techniques de mise en évidence fonctionnelle ---------- 36
a) Substances radiomarquées ---------- 36
b) Substances fluorescentes ---------- 37
c) Test à la calcéine-AM ---------- 40
2. Utilisation de la PCR et de ses dérivées pour localiser et quantifier l'expression de MDR1 et de MRP1 41
a) L'amplification par polymérisations en chaine ---------- 41
b) RT-PCR et RT-PCR quantitative ---------- 43
c) RT-PCR à partir d'une cellule unique ---------- 43

F. Problématique ---------- 45

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES ---------- 48

A. Odorants, substances pharmacologiques et solutions. ---------- 48
1. Odorants ---------- 48
2. Substances chimiques et pharmacologiques ---------- 49
a) 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) ---------- 50
b) Préparation des solutions mère des bloqueurs de MDR1 ---------- 50
c) Préparation des solutions mères des bloqueurs de MRP1 ---------- 50
d) calcéine Acétoxyméthyl Ester (calcéine-AM) ---------- 51
e) Fura2 Acétoxyméthyl ---------- 52
f) Fluo 3 acétoxyméthyl et fluo 4 acétoxyméthyl ---------- 52
g) Calcium Green 1 Acétoxyméthyl ---------- 52
h) Fluoresceine β-D-galactopyranoside (FDG) ---------- 52
3. Solutions ---------- 53
a) Ringer standard et solution à forte concentration en potassium ---------- 53
b) Ringer à Oxygéner ---------- 54
c) Ringer d'après la composition du mucus olfactif ---------- 54
d) Ringer modifié contenant du glycérol ---------- 55

B. Modèles animaux ---------- 55
1. Souris transgéniques FVB/Ntac mrp1 $^{-/-}$ ---------- 56

C. Imagerie par fluorescence : test fonctionnel à la calcéine-AM ---------- 56
1. Préparation en tranches ---------- 56
2. Enregistrements ---------- 57
3. Effectifs ---------- 58
4. Traitements et analyses des données ---------- 58
a) Test fonctionnel à la calcéine : ---------- 59

D. Enregistrements électrophysiologiques : Electro-olfactogrammes (EOG) ---------- 60
1. Aspect technique ---------- 60
a) Préparation de la muqueuse olfactive principale ---------- 60
b) Descriptif du poste d'enregistrement ---------- 60
c) Système de stimulation olfactive ---------- 61
d) Sites d'enregistrement ---------- 62
2. Protocole d'enregistrement ---------- 63
a) Effectifs ---------- 63
b) Déroulement des enregistrements ---------- 64
3. Traitements et analyses des données ---------- 65

E. Rétro-transcription et amplification via réactions en chaîne par polymérase (RT-PCR) -------- 66

1. RT-PCR partir du tissu entier ---------- 66
a) Isolation de l'ARN messager ---------- 66
b) Rétro-transcription ---------- 66
c) Amplification via réaction en chaîne par polymérase ---------- 67
2. RT-PCR à partir de cellules uniques ---------- 68
a) Récupération du tissu et dissociation cellulaire ---------- 68
b) Récupération de cellules de l'épithélium olfactif dissocié ---------- 68
c) Rétro-transcription ---------- 69
d) Amplification via réaction en chaîne par polymérase ---------- 69

III. RÉSULTATS ---------- 71

A. Test fonctionnel à la calcéine-AM ---------- 71
1. Difficultés rencontrées en imagerie par fluorescence ---------- 71
a) L'intensité du signal lumineux et les difficultés de chargement des sondes fluorescentes ------- 71
b) Mouvements intrinsèques de la préparation ---------- 72
c) Maintien en survie de la préparation. ---------- 73
d) Détermination de la longueur d'onde d'excitation optimale. ---------- 74
2. Test à la calcéine-AM sur tranches coronales de la cavité nasale de rat et de souris ---------- 75
a) Localisation du chargement ---------- 75
b) Variabilité entre les échantillons ---------- 76
3. Effet de bloqueurs de MDR 1 et de MRP1 sur le chargement de la calcéine chez la souris nouveau-née 78
a) Récapitulatif ---------- 83
4. Effet de bloqueurs de MDR 1 et de MRP1 sur le chargement de la calcéine chez le rat nouveau-né 88
a) Récapitulatif ---------- 93
5. Effet de bloqueurs de MDR 1 et de MRP1 sur le chargement de la calcéine chez la souris transgénique FVB/Ntac Mrp1 ¯/¯nouveau-née ---------- 98
a) Dans la condition contrôle ---------- 98
6. Effet des Bloqueurs de MDR1 et de MRP1 chez la souris transgéniques FVB/Ntac Mrp1 ¯/¯, nouveau-née. ---------- 99
a) Récapitulatif ---------- 102

B. Electro olfactogrammes ---------- 107
1. Préambule ---------- 107
a) Electro-olfactogrammes en réponse à diverses stimulations ---------- 108
b) Variations des Electro olfactogrammes en condition standard ---------- 113
2. Effets de l'application de bloqueurs de MRP1 et de MDR1 sur la réponse olfactive ---------- 114
a) Effets du vérapamil ---------- 114
b) Effets de la cyclosporine A ---------- 123
c) Effets du MK571 ---------- 133
d) Effets du probénécide ---------- 142
e) Récapitulatif ---------- 152

C. Mise en évidence par RT-PCR de l'expression de Mdr1 et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif 155
1. Chez la souris ---------- 155
2. Chez le rat ---------- 156
3. RT-PCR chez la souris mutante ---------- 157
4. RT-PCR sur cellules dissociées de l'épithélium olfactif de rat et de souris. ---------- 158

IV. DISCUSSION ---------- 162

A. Variabilité des résultats : ---------- 162
1. Variabilité des ratios d'accumulation de la calcéine dans la muqueuse olfactive. ---------- 162

2. Variabilité de l'amplitude des EOG ---------- 163

B. Expression de P-gp et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif ---------- 164
1. Expression de P-gp ---------- 164
2. Expression de Mrp1 ---------- 165

C. Activité de P-gp et de Mrp1 dans la muqueuse olfactive ---------- 165
1. Effets des bloqueurs de P-gp et de Mrp1 chez le rat et la souris de lignée sauvage ---------- 165
2. Effets des bloqueurs de P-gp et de Mrp1 chez la souris transgénique mrp1$^{-/-}$ ---------- 166
3. Localisation cellulaire de l'activité de P-gp et de Mrp1 ---------- 167

D. Diminution de l'amplitude des réponses olfactives en présence des bloqueurs de P-gp et de Mrp1. 168
1. Comment expliquer la diminution de l'amplitude des EOG en présence des bloqueurs de P-gp et de Mrp1 ? 169
2. P-gp et Mrp1 peuvent-ils avoir une influence sur la transduction du signal olfactif ? ---------- 171

V. CONCLUSION ---------- 175

VI. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ---------- 178

ANNEXES ---------- I

A. Forum des jeunes chercheurs, 2009, DIJON, FRANCE. ---------- II

B. XXth.European Chemoreception Research Organization Congress, 2010, AVIGNON, FRANCE. II

C. Functional Evidence of Multidrug Resistance Transporters (MDR) in Rodent Olfactory Epithelium. PLoS One. 2012;7(5):e36167. Epub 2012 May 1. ---------- II

Introduction

I. Introduction

L'olfaction est un sens chimique qui permet d'extraire des informations de l'environnement sous la forme de molécules odorantes volatiles. Le système olfactif qui assure la perception de ces molécules odorantes possède, sous la forme d'une muqueuse olfactive, une interface directe avec le milieu extérieur. Cette interface avec l'environnement soumet la muqueuse olfactive à de nombreuses contraintes physiques et chimiques. En termes de contraintes chimiques, la muqueuse olfactive est exposée à des substances étrangères appelées xénobiotiques qui peuvent être potentiellement toxiques pour l'organisme.

Les tissus de l'organisme exposés au milieu extérieur comme la muqueuse olfactive possèdent de nombreux mécanismes de détoxication qui permettent d'évacuer les xénobiotiques sous leur forme initiale ou bien métabolisée. Dans l'ensemble de ces tissus, l'évacuation des xénobiotiques est assurée en partie par des transporteurs de la famille ABC (ATP Binding cassette) mais cela reste encore à démontrer dans la muqueuse olfactive.

Dans cette famille ABC, deux transporteurs en particulier ont la capacité d'extraire via un transport actif une large gamme de substances très variées. On considère qu'ils sont impliqués dans le phénomène de résistance à de multiples drogues également appelée résistance pléiotropique.

Ces transporteurs sont la protéine de résistance à de multiples drogues de type 1 (Mdr1 ou P-gp pour P-glycoprotéine) et la protéine associée à la résistance à de multiples drogues de type 1 (Mrp1).

Les cellules présentant cette résistance pléiotropique ont la capacité de rejeter les substances xénobiotiques et les empêchent de séjourner librement dans leur cytoplasme. La résistance des cellules peut être intrinsèque mais peut aussi être induite par une exposition à certaines substances. Elle est également manifeste chez de nombreuses lignées cellulaires cancéreuses à cause d'une surexpression de P-gp et/ou de Mrp1.

Cette résistance qui est bénéfique pour la survie des cellules, en contrepartie, empêche les agents pharmacologiques d'atteindre leur cible intracellulaire.

De nombreuses études ont été menées afin d'élaborer des traitements anticancéreux capables de contourner cette résistance. Il en a découlé la découverte de nombreux substrats et inhibiteurs spécifiques de P-gp et/ou de Mrp1.

Certaines sondes fluorescentes sont des substrats de ces transporteurs, ce qui explique la difficulté voire l'impossibilité du chargement de celles-ci par les cellules résistantes. Il est possible alors de

contrer ce phénomène de résistance en utilisant des inhibiteurs de P-gp et/ou de Mrp1. L'utilisation conjointe de sondes fluorescentes avec des inhibiteurs de P-gp et de Mrp1 est devenu une approche standard de mise en évidence du phénotype cellulaire de résistance pléiotropique.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons dans un premier temps cherché à mettre en évidence l'expression d'une résistance pléiotropique dans l'épithélium olfactif de rats et de souris. Pour cela nous avons utilisé un test fonctionnel à la calcéine conjointement avec des inhibiteurs de P-gp et de Mrp1. Les résultats obtenus pourraient servir dans le domaine de la toxicologie en apportant des données inédites sur le rôle de barrière pharmacologique de l'épithélium olfactif.

Dans un seconde temps, nous nous somme intéressé à l'influence que pourrait avoir cette résistance pléiotropique sur la fonction sensorielle de l'épithélium olfactif, à savoir la perception des molécules odorantes. Pour cela nous avons utilisé une technique d'électro olfactogramme qui nous a permis d'enregistrer la réponse aux odorants de l'épithélium olfactif en inhibant ou pas l'activité de P-gp et de Mrp1. Les résultats obtenus pourraient nous renseigner sur le traitement des molécules odorantes par l'épithélium olfactif en tant que xénobiotiques.

Le recoupement des résultats obtenus avec ces deux approches pourrait apporter des informations très utiles en imagerie par fluorescence sur des préparations fonctionnelles. En particulier sur l'amélioration du chargement de sondes fluorescentes et l'induction de perturbations de la physiologie du tissu.

A. Physiologie de l'olfaction

1. Anatomie du système olfactif

Chez les rongeurs, le système sensoriel olfactif est un système pair. La partie périphérique représentée par l'organe récepteur est répartie de façon symétrique dans chaque narine. La partie centrale, située dans la boite crânienne, reçoit les informations de la périphérie au niveau d'un organe relai bien individualisé, le bulbe olfactif qui lui projette sur un cortex primaire, le cortex piriforme.

La cavité nasale est délimitée côté ventral par la lame horizontale du palatin qui la sépare de la cavité buccale. Le toit de la cavité nasale est délimité dans la partie rostrale par l'os nasal puis dans la partie caudal par la lame criblée de l'ethmoïde. La cavité nasale est partagée en deux par une paroi médiane, le septum. Les parties latérales sont délimitées par les os maxillaires et les masses latérales de l'éthmoïde. Sur les masses latérales de l'ethmoïde on trouve sept cornets qui sont des excroissances osseuses qui délimitent des méats, cavités optimisant le contact de l'air avec la plus grande surface de

muqueuse possible. Ces cornets placés sur le chemin du flux d'air vont permettre par turgescence/rétractation de moduler son débit en cas d'augmentation du besoin d'apport en oxygène par exemple.

Les cornets et le septum sont intégralement recouverts d'une muqueuse. Cette muqueuse est constituée en profondeur d'une *lamina propria* composée de tissu conjonctif, elle est fortement vascularisée et abrite les glandes de Bowman qui sécrètent le mucus qui baigne la muqueuse olfactive, en continuité avec le mucus qui recouvre le reste de la cavité nasale. Au-dessus de la *lamina propria* se trouve une lame basale et l'épithélium olfactif. Il y a deux types d'épithéliums dans la cavité nasale, un épithélium respiratoire monostratifié constitué de cellules ciliées qui recouvre la partie rostrale du septum et des cornets, et un épithélium pseudo-stratifié, composé de plusieurs types cellulaires, qui recouvre le territoire récepteur olfactif.

Le mucus sécrété est une substance visqueuse constituée d'eau, d'ions et de glycoprotéines. Il a un rôle d'humidification, de réchauffement et de filtration de l'air grâce à un contact maximisé dans les méats. Il a aussi un rôle de protection vis-à-vis des épithéliums sous-jacents. Il les protège du dessèchement, des infections et des agressions chimiques. D'un côté, il est sécrété en permanence par les glandes de Bowman et, d'un autre côté, il est évacué grâce aux battements des cils des cellules de l'épithélium respiratoire.

2. Organisation du système olfactif

Le sens de l'olfaction couvre différentes fonctions allant de l'identification de la nourriture à l'apprentissage d'un comportement en passant par la communication interindividuelle. Cette large gamme d'implications en fait, chez certaines espèces, dont les rongeurs, est répartie dans plusieurs sous-systèmes chimiosensibles. Ces différents sous-systèmes fonctionnent en parallèle et sont individualisés par leur localisation dans la cavité nasale, par les récepteurs qu'ils expriment, par leurs voies de transduction et par la cible de leurs projections (Figure 1). (pour revue : (Munger et al., 2009))

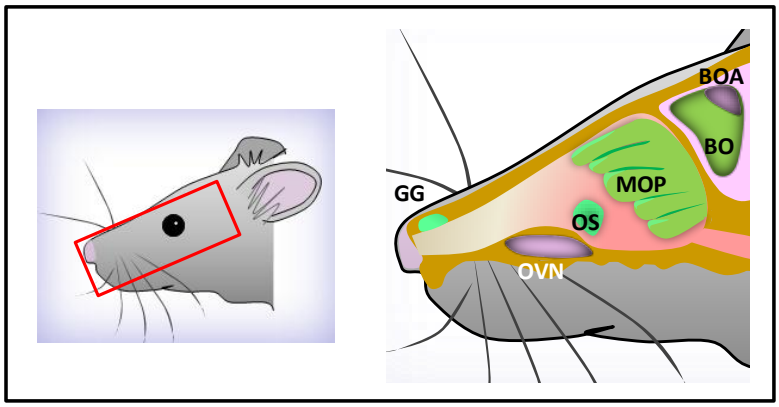


Figure 1: Dessins de l'ensemble des sous-systèmes olfactifs. A gauche, sur la tête d'un rongeur est délimitée la région où se situent les sous-systèmes olfactifs. A droite, le schéma révèle l'organisation des sous-systèmes olfactifs avec, dans la cavité nasale, le ganglion de Gruneberg (**GG**), l'organe voméro nasal (**OVN**), l'organe septal de Masera (**OS**) et la muqueuse olfactive principale (**MOP)**. Dans la boîte crânienne on trouve le bulbe olfactif (**BO**) et le bulbe olfactif accessoire (**BOA**). (Schéma utilisé avec l'aimable consentement du Dr H. Cadiou)

a) L'organe olfactif principal

Le sous-système le plus important est l'épithélium olfactif principal. Il se situe de chaque côté du septum et sur la partie caudale des cornets. Il est constitué en majeure partie de neurones sensoriels olfactifs utilisant la voie de transduction de l'AMPc et projetant leur axone dans les glomérules du bulbe olfactif principal qui fait relais avec l'amygdale olfactive et le cortex olfactif. Ces neurones olfactifs expriment les récepteurs aux odorants. L'épithélium olfactif principal comprend d'autres types de cellules sensorielles beaucoup moins nombreuses décrites plus loin dans ce manuscrit.

b) L'organe voméronasal

L'organe voméronasal est un sous-système olfactif connu pour son implication dans la détection des phéromones (pour revue : (Mucignat-Caretta, 2010)). Il est inclus dans la lame nasopalatine, juste à la base du septum. On y trouve cinq types de neurones sensoriels. Ces neurones ont une voie de transduction différente de celle des neurones olfactifs puisqu'ils expriment une autre protéine G que G_{olf} et seulement certains expriment des récepteurs aux odorants. En effet, les neurones de l'organe voméronasal expriment principalement des récepteurs du type V1R (récepteurs aux phéromones), V2R (récepteurs aux peptides et protéines) et quelques-uns expriment des récepteurs aux formyles peptides impliqués dans la réponse immunitaire. Ces neurones projettent des axones dans diverses régions du bulbe olfactif accessoire.

c) L'organe septal de Masera

L'organe septal de Masera est un petit îlot d'épithélium pseudo-stratifié entouré d'épithélium respiratoire situé proche de la base du septum au niveau de l'ouverture des conduits de la lame nasopalatine. Les neurones sensoriels sont très similaires aux neurones olfactifs. Ils expriment des récepteurs olfactifs et 90 % de ces récepteurs correspondent à neufs récepteurs du répertoire. Ces neurones utilisent la voie de transduction de l'AMPc. On leur connaît actuellement une fonction de détection de stimuli odorants et aussi de stimuli mécaniques (Ma et al., 2003). Les neurones de l'organe septal projettent leur axone dans le bulbe olfactif principal.

d) Le ganglion de Grueneberg

Le ganglion de Gruneberg est une grappe 300 à 500 cellules situées à l'extrémité rostrale de la cavité nasale. Ces cellules ne semblent pas avoir accès au milieu extérieur (Gruneberg, 1973). Ces cellules expriment OMP mais ont une morphologie radicalement différente des neurones olfactifs. Elles sont rondes possèdent un axone et quatre à huit cils. Elles présentent aussi de trente à quarante cils regroupés en packs et profondément enfouis dans le cytoplasme (Brechbuhl et al., 2008). Le rôle de ce ganglion reste à élucider, bien que des études récentes tendent à montrer que chez la souris nouveau-née certains de ses neurones répondent à la fois à certains odorants (Mamasuew et al., 2011) et au froid (Schmid et al., 2010).

3. Organisation de l'épithélium olfactif principal

Les principaux types cellulaires qui composent l'épithélium olfactif sont les neurones sensoriels, les cellules de soutien, les cellules à microvillosités et les cellules basales (Figure 2). Ces types cellulaires sont répartis à différents niveaux dans l'épaisseur de la muqueuse. L'épithélium olfactif est pseudo stratifié, il s'organise en six couches parallèles à la surface de l'épithélium qui ont été identifiées chez le rat nouveau-né en fonction de leur activité métabolique (Pataramekin and Meisami, 2005). La couche la plus profonde est composée des cellules basales horizontales, au-dessus se trouve la couche des cellules basales globulaires et des neurones olfactifs immatures. La troisième couche est principalement constituée des corps cellulaires des neurones olfactifs matures. La quatrième contient les dendrites des neurones olfactifs ainsi que la partie la plus volumineuse des cellules de soutien, qui contient leur noyau. La cinquième couche est constituée de l'extrémité apicale des cellules de soutien et des dendrites des neurones. La sixième et dernière couche est constituée des cils des neurones olfactifs matures et des microvilli des cellules de soutien (Figure 3).

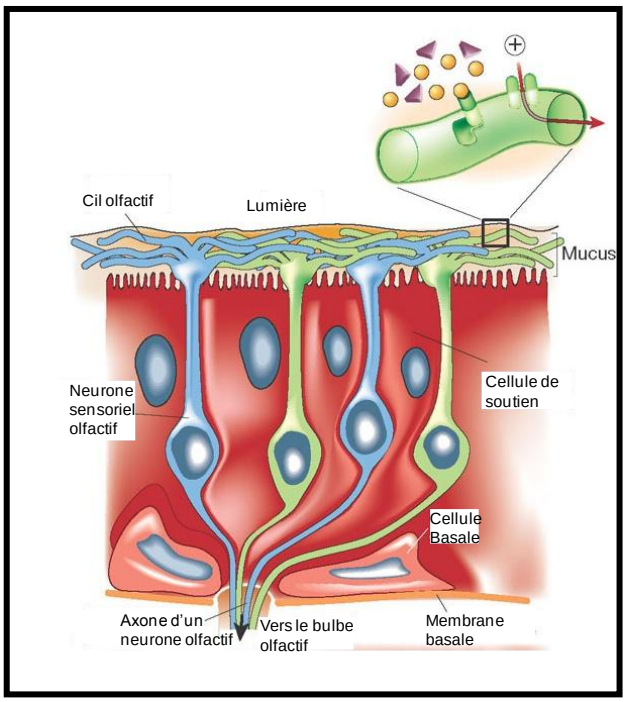


Figure 2: Schéma de l'organisation cellulaire de l'épithélium olfactif. A la surface de l'épithélium on trouve le mucus où baignent les cils des neurones sensoriels olfactifs. Ces cils possèdent les récepteurs aux odorants. Les cellules de soutien enserrent les dendrites des neurones olfactifs. Dans les couches inférieures de l'épithélium on trouve les cellules basales. La membrane basale sépare l'épithélium olfactif de la ***lamina propria***. Chaque neurone olfactif projette un axone à travers la lame basale vers le bulbe olfactif. D'après (Firestein, 2001)

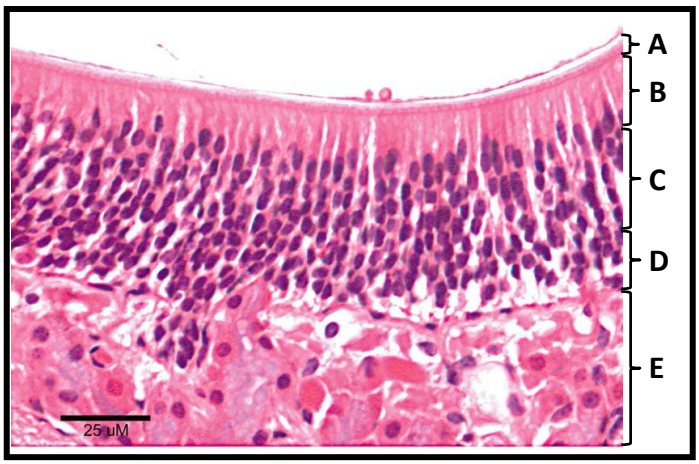


Figure 3: Tranche coronale de l'épithélium olfactif de souris adulte. Marquage à l'hématoxyline et à l'éosine. **A** : couche contenant les cils, les vésicules olfactives et l'extrémité apicale des cellules de soutien. **B** : couche contenant les dendrites des neurones olfactifs et la partie la plus volumineuse des cellules de soutien. **C** : couche principalement constituée du corps cellulaire des neurones olfactifs. **D** : couche contenant les cellules basales et le pied des cellules basales. **E** : ***lamina propria*** contenant les axones des neurones olfactifs regroupés en faisceaux, les acini des glandes de Bowman et les capillaires. D'après (Grubb et al., 2007)

a) *Neurones sensoriels olfactifs*

Les neurones récepteurs olfactifs sont des cellules bipolaires avec un diamètre de l'ordre de 5µm (Figure 4). Du coté apical ils émettent une dendrite terminée par une vésicule olfactive dont une dizaine de cils émergent et s'étendent sur plus de 50 µm à la surface de l'épithélium, baignés par le mucus. A leur base, en profondeur, ils émettent un axone non myélinisé qui va rejoindre les axones d'autres neurones sensoriels en un faisceau protégé par des cellules de Schwann qui traverse la lame criblée de l'ethmoïde et faire synapse avec des interneurones, des neurones relais du bulbe olfactif, cellules mitrales et cellules à panache. Les synapses des neurones récepteurs avec les cellules relais se font dans des structures sphériques ne contenant que des ramifications dendritiques et axonales appelées glomérules du bulbe olfactif. La durée de vie des neurones récepteurs est limitée, de l'ordre de 30 jours. Leur population est renouvelée en permanence et on retrouve un gradient de neurones olfactifs immatures vers matures dans l'épaisseur de la muqueuse de la profondeur vers la surface. En fait, il existe d'autres types de neurones sensoriels dans l'épithélium olfactif. Ces divers types permettent la détection de divers stimuli comme le CO_2, des peptides ou des phéromones, et sont très largement moins nombreux que les neurones olfactifs proprement dits.

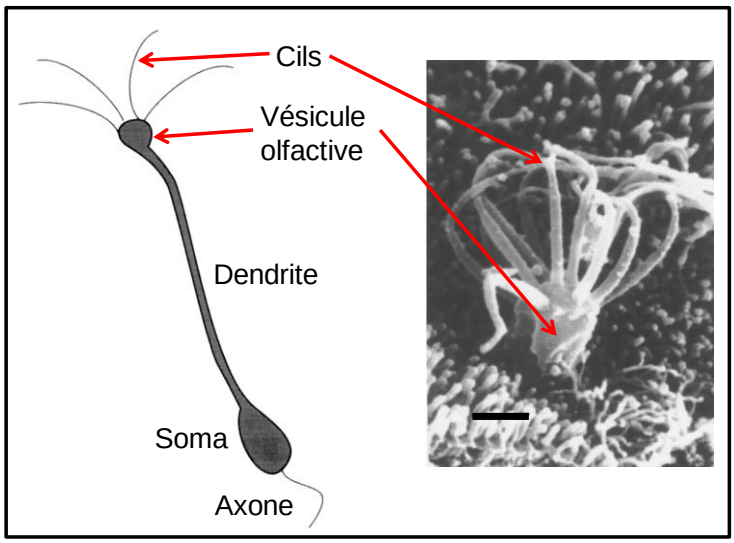


Figure 4:Morphologie d'un neurone sensoriel olfactif. A gauche de la figure, dessin d'un neurone olfactif. Les récepteurs olfactifs sont situés sur les cils. La transduction du signal s'effectue à partir des cils jusqu'à la vésicule olfactive. Il y a un couplage électrique entre la vésicule olfactive et le soma par l'intermédiaire du dendrite. Le potentiel d'action est généré à la base de l'axone. A droite de la figure, une photo d'une vésicule et de cils olfactifs qui émergent à la surface de l'épithélium olfactif, entourés des microvilli des cellules de soutien. Echelle=1 µm. D'après Schild et Restrepo. (Schild and Restrepo, 1998)**.**

Neurones olfactifs proprement dits

Grâce aux avancées dans le domaine de la biologie moléculaire, Linda Buck et Richard Axel en 1991 ont été les premiers à cloner des récepteurs olfactifs (Buck and Axel, 1991). Ils ont montré que les récepteurs olfactifs sont exprimés à partir d'une vaste famille multigénique. Des milliers de récepteurs différents sont impliqués dans la détection des odorants. Ils ont ainsi ouvert la voie pour la compréhension du codage olfactif. Ces travaux leur ont valu l'attribution du prix Nobel de médecine en 2004. Les récepteurs aux odorants sont exprimés sur les cils des neurones olfactifs. Majoritairement, un neurone olfactif n'exprime qu'un seul récepteur parmi plus de 1000 chez la souris (Zhang and Firestein, 2002). Les neurones exprimant un même récepteur sont distribués dans une même région de la muqueuse olfactive principale mais, à l'intérieur de ce territoire, sont répartis aléatoirement parmi d'autres neurones porteurs d'autres récepteurs, formant ainsi une mosaïque fonctionnelle (Ma and Shepherd, 2000). Les neurones olfactifs exprimant le même récepteur projettent leurs axones dans un ou deux mêmes glomérules parmi plus de 2000 du bulbe olfactif principal. La transduction du signal se fait par la voie AMPc. Les récepteurs aux odorants peuvent avoir une large spécificité avec différentes affinités ou peuvent faire preuve d'une très forte discrimination (Malnic et al., 1999). Ceci permet à partir d'une variété limitée de récepteurs d'obtenir un encodage combinatoire quasi illimité de toutes les formes moléculaires possibles (Figure 5). De cette manière, à chaque espèce odorante correspond finalement un motif spécifique d'activation glomérulaire, un sous-ensemble de glomérules activés typique du stimulus.

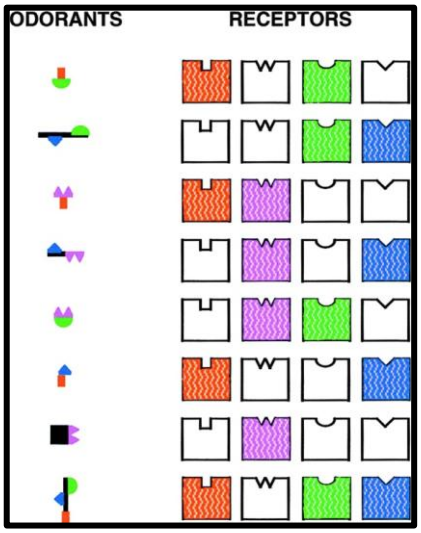


Figure 5: Code combinatoire des récepteurs olfactifs. Dans cet exemple, les récepteurs colorés sont les récepteurs qui reconnaissent les l'odorant présenté à gauche. Chaque odorant active une combinaison particulière de récepteurs. Chaque récepteur peut être impliqué dans le pattern d'activation d'un très grand nombre d'odorants. Vu le nombre de combinaisons possibles, cela permet la discrimination d'une quantité pratiquement illimité d'odorants différents. D'après (Malnic et al., 1999)

Neurones sensoriels olfactifs exprimant un récepteur TAAR

Un autre type de neurones sensoriels a été mis en évidence récemment. Ces neurones expriment un récepteur TAAR à la place d'un récepteur olfactif (*trace amine-associated receptor*) (Liberles and Buck, 2006). Ils représentent dans la muqueuse olfactive principale à peu près 1 neurone sensoriel sur 1000.Trois types de récepteurs TARR ont été identifiés (TARR3 , TARR4, TARR5) et les neurones sensoriels qui les expriment répondent à différents stimuli impliqués dans la communication intra-espèce, détectent des phéromones émises par l'urine et représentant diverses informations sociales. En fait ces neurones semblent être relativement similaires des neurones olfactifs et on pense qu'ils utilisent aussi la voie de transduction de l'AMPc.

Neurones sensoriels olfactifs exprimant un récepteur GC-D

D'autres neurones sensoriels utilisent une voie de transduction impliquant une guanylate cyclase, qui produit du GMPc (Leinders-Zufall et al., 2007). Ils représentent moins de 0,1 % des neurones de la muqueuse olfactive principale. Leur fonction reste à élucider, on leur connait une sensibilité à des hormones natriurétiques ainsi qu'au CO_2. Ils projettent leurs axones dans une région particulière du bulbe olfactif principal constituant un collier de glomérules.

Neurones sensoriels olfactifs exprimant un canal TRP

Une sous population de neurones sensoriels exprime des canaux TRP (*transient receptor potential*). On trouve trois isoformes de ces canaux, les TRPC2, TRPC6, et TRPM5 (Elsaesser et al., 2005). Chez la souris, les neurones TRPM5 répondent à la 2,5-diméthyl pyrazine et à la 2-heptanone. Les neurones TRP6 répondent au lilial.

b) Cellules de soutien

Les cellules de soutien sont des cellules bipolaires qui s'étirent de la lame basale jusqu'à la surface de l'épithélium olfactif. En effet, du côté apical leurs corps cellulaires contenant leurs noyaux forment une monocouche qui représente la quasi intégralité de la surface de l'épithélium. A leur surface elles portent des microvilli qui permettent des échanges avec le mucus. Cette partie apicale des cellules de soutien isole de façon serrée les dendrites des neurones olfactifs. Les cellules de soutien s'insinuent entre les autres types cellulaires, de la couche des neurones jusqu'à la lame basale. Elles ont un rôle proche de celui des cellules gliales. Elles assurent l'homéostasie des neurones olfactifs et les protègent des agressions toxiques provenant du milieu extérieur. On leur reconnaît aussi un rôle de phagocytose (Suzuki et al., 1996) participant donc à la gestion des populations cellulaires, produisant aussi des facteurs de croissance à destination des neurones olfactifs en développement. Elles participent aussi à la sécrétion du mucus.

c) Cellules basales

On trouve deux types de cellules basales, les cellules basales horizontales et les cellules basales globulaires. Les cellules basales horizontales sont situées juste au-dessus de la lame basale de l'épithélium olfactif, elles contiennent des cytokératines, des filaments intermédiaires et des tonofilaments caractéristiques des cellules épithéliales prolifératives. Les cellules basales globulaires sont situées au-dessus, entre les cellules basales horizontales et les corps cellulaires des neurones olfactifs immatures. Ce sont des cellules multipotentes qui ont une forte prolifération. Par le jeu de différents facteurs humoraux elles vont passer par différents stades avant de devenir des précurseurs neuronaux. Ces précurseurs neuronaux vont donner des cellules filles neuronales qui vont se différencier en neurones sensoriels olfactifs immatures puis matures (Caggiano et al., 1994).

d) Cellules à microvillosités

Il existe plusieurs types de cellules avec microvillosités dont la fonction n'est pas encore bien connue. Certaines sont du type neurones sensoriels olfactifs et projettent un axone vers le bulbe olfactif, d'autres ne projettent pas d'axone vers le bulbe olfactif mais sont tout de même sensibles aux stimuli odorants (Elsaesser et al., 2005; Jourdan, 1975).

4. Transduction du signal sensoriel

La transduction du signal sensoriel consiste en un changement de modalité lors de la transmission de l'information. Dans le cas de l'olfaction, l'information se présente aux cellules réceptrices sous une forme chimique, les molécules odorantes, et va être transmise sous la forme de signaux électriques, les potentiels d'action. Le siège de cette transduction se situe au niveau des neurones sensoriels olfactifs (pour revue (Kato and Touhara, 2009; Kleene, 2008)). La nature des stimuli et les modalités de la transduction du signal dans le cas de l'olfaction sont décrites ci-après.

a) Nature des stimuli olfactifs

Les signaux olfactifs se présentent en général sous forme de mélanges complexes de molécules odorantes. Dans la vie terrestre, ces molécules odorantes sont des composés chimiques volatiles qui peuvent être hydrophobes ou hydrophiles. Ils offrent une grande variété de familles chimiques; on peut trouver par exemple des aldéhydes, des alcools ou des esters, et présentent une multitude de structures spatiales. La volatilité et la solubilité dans le mucus des molécules odorantes sont deux propriétés physiques qui influencent la perception. La volatilité représente la pression partielle maximale que l'on peut avoir en phase gazeuse au-dessus d'un solide ou d'un liquide, pour une substance donnée à une température et une pression données. La solubilité dans le mucus dépend de la nature plus hydrophile ou hydrophobe de la molécule odorante.

b) Acheminement des stimuli olfactifs

Les stimuli odorants sont acheminés dans la cavité nasale par inspiration. La durée de l'inspiration et la pression de l'air, le flairage, vont jouer un rôle prépondérant dans la perception des stimuli odorants en optimisant le contact des molécules odorantes avec la muqueuse olfactive.

Le mucus recouvre l'intégralité de l'épithélium olfactif et peut influencer par sa composition la sensibilité des récepteurs pour les odorants (Fukuda et al., 2008). En effet, les molécules odorantes doivent d'abord le traverser avant d'atteindre un récepteur olfactif. Cela ne pose pas de problème pour les molécules hydrophiles au contraire des composés hydrophobes. Des protéines solubles de la famille des lipocalines, les OBP (*odorant binding proteins*) sont sécrétées dans le mucus. Ces protéines ont la propriété de se lier de façon réversible à différents stimuli odorants, notamment aux stimuli odorants hydrophobes. Hypothétiquement, ces protéines pourraient avoir un rôle facilitateur d'accès aux récepteurs olfactifs ou bien un rôle dans le contrôle de la disponibilité des molécules odorantes. D'autres hypothèses suggèrent une action plutôt destinée à l'organe voméro-nasal et impliqueraient les OBP dans la reconnaissance et la perception des phéromones (Pelosi, 2001).

Lorsqu'un stimulus olfactif est composé de plusieurs corps purs, ce qui est le cas de la majorité des stimuli odorants naturels, il peut y avoir compétition au niveau de la fixation des molécules odorantes pour un même récepteur olfactif. Pour certains récepteurs, dans de rares cas, des molécules sont des antagonistes, et leur fixation n'activera pas le neurone (Oka et al., 2004). Des molécules agonistes par contre vont déclencher une chaine de réactions conduisant à la transmission d'une information olfactive.

c) Voie de transduction impliquant l'AMPc

La voie de transduction la plus répandue dans la muqueuse olfactive principale est celle impliquant l'AMPc, second messager intracellulaire, celle des neurones olfactifs proprement dits (Figure 6). Le récepteur olfactif est une protéine à 7 domaines transmembranaires de la famille des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR). La fixation d'un odorant à ce récepteur va déclencher une cascade de transduction qui commence avec l'activation de la protéine $G_{\alpha olf}$ par phosphorylation. Cette protéine G va à son tour activer l'adenylyl cyclase III (ACIII) qui va transformer l'adénosine triphosphate (ATP) en AMPc. L'AMPc va se lier à un canal activé par des nucléotides cycliques (CNG). L'activation de ce canal par l'AMPc provoque l'entrée principalement d'ions Ca^{2+}. Ces ions calcium vont à leur tour provoquer l'ouverture de canaux chlore calcium dépendant et induire une sortie d'ions Cl^- qui va amplifier la dépolarisation du neurone olfactif. Si la dépolarisation atteint un certain seuil, des canaux sodium voltage dépendant présents au niveau du cône d'émergence de

l'axone vont être activés et initier un potentiel d'action. Une boucle de rétroaction négative module la réponse olfactive. Un complexe calcium/calmoduline va se fixer au CNG et provoquer sa fermeture. Ce complexe va activer une protéine kinase calcium/calmoduline dépendante (CaMKII) qui va inactiver l'ACIII par phosphorylation. La CaMKII va aussi activer des phosphodiestérases qui vont hydrolyser l'AMPc (Matthews and Reisert, 2003).

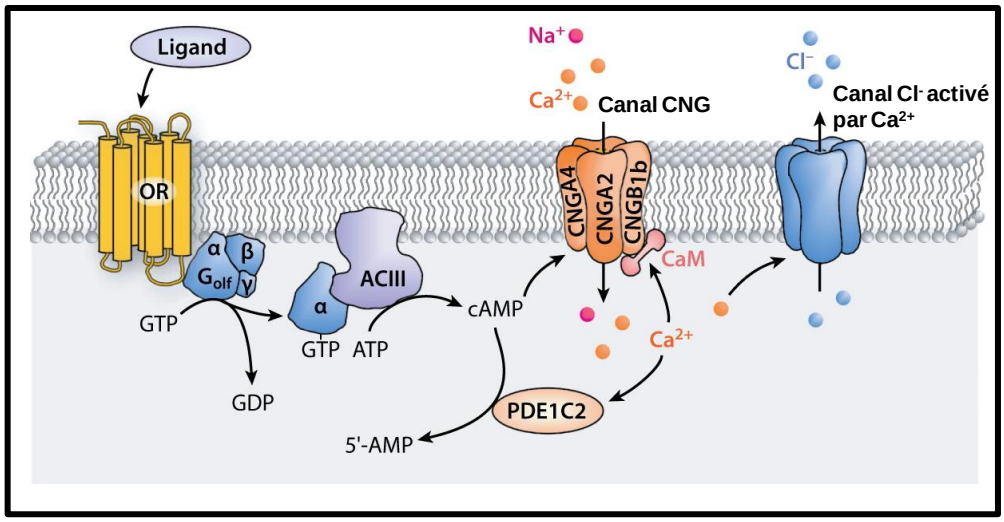


Figure 6: Schéma de la voie de transduction de l'AMPc. La molécule odorante se fixe au récepteur olfactif (OR). Le récepteur active une protéine G (Golf) qui va à son tour activer une adénylyl cyclase (ACIII). L'ACIII va transformer l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc va se fixer à un canal activé par des nucléotides cycliques (canal CNG). Ce canal va provoquer une entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) et sodium (Na^{+}). Les ions Ca^{2+} vont activer un canal qui va provoquer une sortie d'ions chloride (Cl^{-}) qui va amplifier la dépolarisation. Un rétrocontrôle va se mettre en place. Les ions Ca^{2+} vont d'un côté activer une phospodiestérase (PDE1C2) qui va dégrader l'AMPc en 5'-AMP et d'un autre côté, ils vont former un complexe avec la calmoduline (CaM) qui va fermer le canal CNG. D'après la revue de S. D. Munger (Munger et al., 2009)

d) Voie de transduction impliquant la phospholipase C

Dans certains neurones sensoriels olfactifs, en particulier chez le poisson (Huque and Bruch, 1986), on trouve une voie de transduction alternative à celle impliquant l'AMPc. On trouve cette voie principalement dans les neurones de l'organe vomeronasal exprimant le récepteur V1R (Figure 7). Lors de la fixation d'un odorant au récepteur, celui-ci active une protéine G. Cette protéine G va activer la phospholipase C qui va transformer la phosphatidyl inositol biphosphate (PIP_2) en inositol triphosphate (IP3) plus diacylglycérol (DAG). Le DAG va activer un canal de potentiel récepteur transitoire (TRPC2) qui va provoquer une dépolarisation par une entrée d'ions calcium dans le milieu intracellulaire. Il y a un rétrocontrôle par le complexe calcium/calmodulin au niveau de TRPC2.

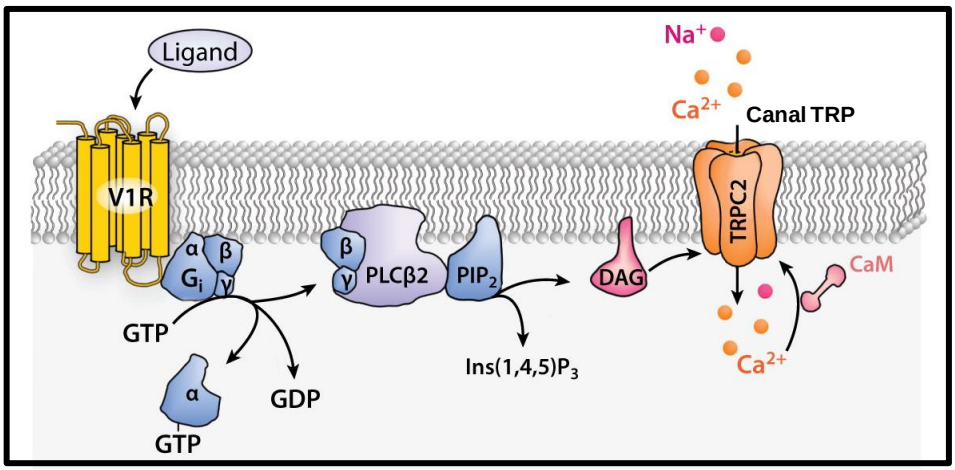


Figure 7: Schémas de la voie de transduction de la Phospholipase C. Lorsque le ligand se fixe au récepteur (**V1R**), le récepteur active une protéine G (**Gi**) cette protéine G va activer une phospholipase C (**PLCβ2**) qui va transformer le phosphoinositol di-phosphate (**PIP_2**) en inosito triphosphate (Ins(1,4,5)P_3) d'une part et en diacyl glycérol (**DAG**) d'autre part. Le DAG va activer un canal de potentiel récepteur transitoire (**canal TRP**). Ce canal TRP va libérer l'entrée d'ions calcium (**Ca^{2+}**) et sodium (**Na^+**) dans le milieu intracellulaire, donnant naissance à une dépolarisation du neurone sensoriel olfactif. Il y a un rétrocontrôle par le complexe calcium calmoduline (**CaM**) qui va fermer le canal TRP. D'après la revue de S. D. Munger (Munger et al., 2009)

e) Voie de transduction impliquant la GMPc

La sous population de neurones olfactifs de la muqueuse olfactive principale exprimant le récepteur GC-D font appel à une voie de transduction impliquant la GMPc (Figure 8). Lors de la fixation d'un ligand, le récepteur GC-D active une guanylyl cyclase qui va transformer du GTP en GMPc. Le GMPc va activer un canal CNGA qui va permettre une dépolarisation par une entrée d'ions calcium dans le milieu intracellulaire.

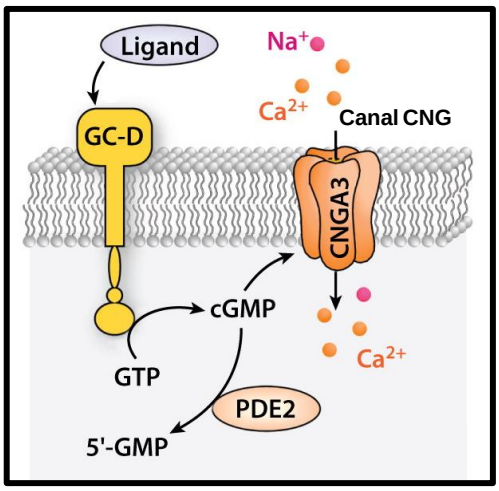


Figure 8: Schéma de la voie de transduction de la GMPc. Lorsque le ligand se fixe au récepteur guanylyl cyclase (**GC-D**), le récepteur transforme la guanosine triphosphate (**GTP**) en guanosine monophosphate cyclique (**GMPc**). La GMPc va se fixer à un canal activé par des nucléotides cycliques (**CNGA3**). Cela provoque une entrée d'ions calcium (**Ca^{2+}**) et sodium (**Na^{+}**) dans le milieu intracellulaire, ce qui va résulter en une dépolarisation du neurone sensoriel olfactif. Il y a un rétrocontrôle par le Ca^{2+} qui va activer une phosphodiestérase (**PDE2**) qui va dégrader le GMPc en 5'-GMP. D'après la revue de Munger et al., 2009.L'information olfactive va transiter à travers les axones des neurones sensoriels olfactifs. Ces axones, après avoir traversé la lame criblée de l'éthmoïde, vont effectuer une première synapse dans le bulbe olfactif avec des interneurones ou bien directement avec les neurones de second ordre, neurones relais du bulbe olfactif.

5. De la périphérie au système nerveux central

Le bulbe olfactif est le premier relais de l'information olfactive en provenance de la périphérie. C'est une structure paire du système nerveux central située en avant du cerveau.

a) Organisation du bulbe olfactif

Le bulbe olfactif est organisé en cinq couches principales concentriques (Figure 9).

1. La couche des nerfs olfactifs, la plus externe, qui est constituée de la partie distale des axones des neurones olfactifs.

2. La couche glomérulaire, constituée des glomérules. Les glomérules sont des amas constitués d'axones des neurones olfactifs, de dendrites des cellules mitrales et des cellules à panache. Ils sont le siège de nombreuses synapses excitatrices glutamatergiques entre ces trois types cellulaires. Les cellules juxtaglomérulaires étendent leurs dendrites entre les glomérules adjacents et forment des synapses inhibitrices gabaergiques avec les dendrites de diverse provenance présentes dans le glomérule.

3. La couche plexiforme externe contenant surtout des fibres et les corps cellulaires des cellules à panache.

4. La couche contenant le soma des cellules mitrales. Les cellules mitrales et les cellules à panache sont les cellules de sortie du bulbe olfactif et émettent un axone myélinisé en direction de diverses structures plus centrales.

5. La couche contenant le soma des cellules granulaires. Les cellules granulaires sont des interneurones inhibiteurs insérés entre les axones et les dendrites secondaires des cellules mitrales (Shepherd, 1972).

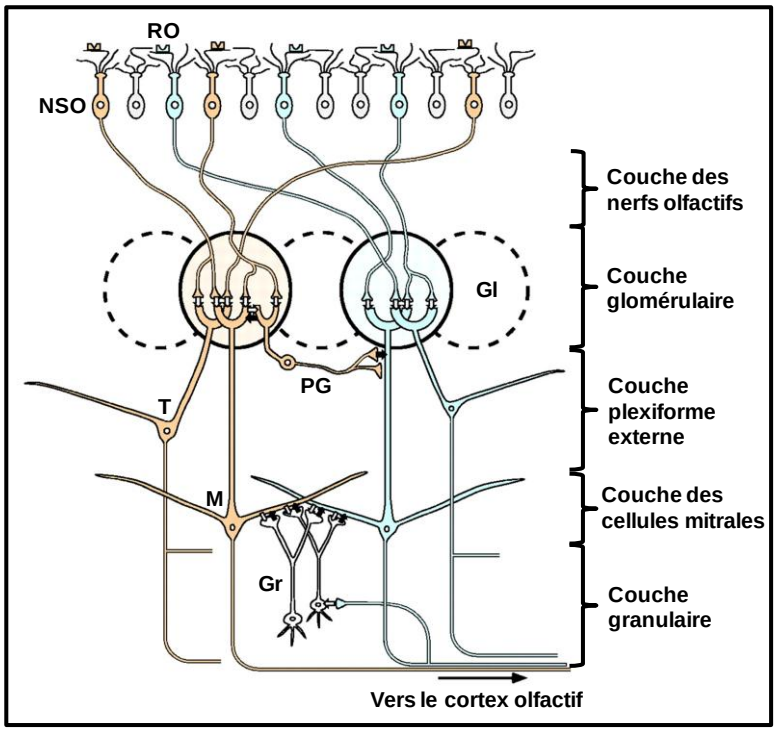


Figure 9: Schéma de l'organisation cellulaire du bulbe olfactif. Au niveau de l'épithélium olfactif, chaque neurone sensoriel olfactif (**NSO**) n'exprime qu'un seul type de récepteur aux odorants (**OR**). Les NSO projettent un axone qui va traverser la lame criblée et atteindre le bulbe olfactif en formant la couche des nerfs olfactifs. Les axones de NSO exprimant le même OR se rassemblent au niveau d'un même glomérule (**Gl**). Les glomérules sont rassemblés dans une même couche. Au sein d'un glomérule les NSO font synapse avec les cellules à panache (**T**), mitrales (**M**). Les cellules périglomérulaires (**PG**) relient deux glomérules. En dessous de la couche glomérulaire se trouve la couche plexiforme externe qui contient surtout le corps cellulaire des cellules à panache. En dessous on trouve répartis dans une couche bien individualisée les corps cellulaires des cellules mitrales. La couche la plus profonde accueil les cellules granulaires (**Gr**) qui font des synapses entre les dendrites des cellules mitrales. Les cellules mitrales et les cellules à panache sont les neurones de sortie qui projettent leurs axones vers le cortex olfactif. D'après Mori et col. (Mori et al., 1999)

b) *Transmission de l'information olfactive à travers le bulbe olfactif*

Chez les mammifères, chaque neurone récepteur olfactif va projeter un axone dans un unique glomérule. Les neurones exprimant le même récepteur olfactif vont converger vers le même glomérule. On retrouve également une corrélation entre la localisation des neurones olfactifs dans l'épithélium olfactif et le glomérule activé. Chez la souris, il y a environ 25000 neurones sensoriels pour un glomérule (Mombaerts et al., 1996).

L'information olfactive subit un premier traitement au niveau du bulbe olfactif sous forme de rétrocontrôles et d'inhibition latérales. Elle en sort principalement par l'intermédiaire des cellules mitrales et les cellules à panache qui se projettent vers le cortex olfactif composé du cortex piriforme, du tubercule olfactif, du cortex entorhinal, du cortex périamygdalien et du noyau olfactif antérieur (Savic et al., 2000) (Figure 10).

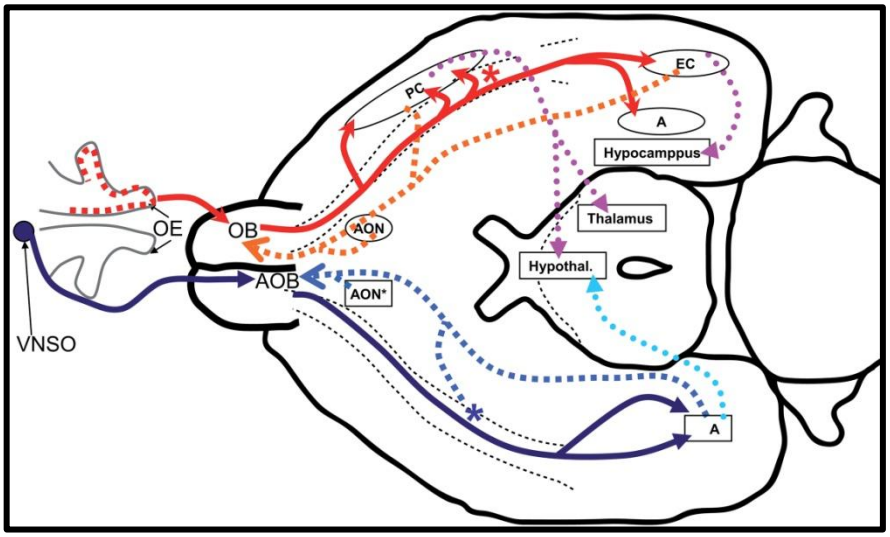


Figure 10: Schéma général des connexions du système olfactif principal et du système olfactif accessoire. Les axones des neurones olfactifs (points rouges au sein de **l'**épithélium olfactif, **OE)** sont projetés vers le bulbe olfactif (**OB),** formant le nerf olfactif**.** Les neurones de projection de l'**OB** envoient leurs axones (tractus olfactif latéral**, LOT)** vers les différentes structures du cortex olfactif dont le noyau antérieur olfactif (**AON),** le ***taenia tecta*,** le tubercule olfactif, le cortex piriforme (**PC)**, le complexe amygdalien (**A**) et le cortex entorhinal (**EC**)**,** et le noyau du tractus olfactif latéral (**nLOT;** astérisque rouge**).** Dans les deux cas**,** le « nerf olfactif » et le **LOT** sont représentés par des flèches rouges épaisses. Les neurones du cortex olfactif et du **nLOT** se projettent dans l'**OB** (flèches orange épaisse). Les principales connections intracorticales (flèches violettes en pointillées**)** se font vers des régions du néocortex**,** l'hippocampe, du thalamus et de l'hypothalamus**,** ainsi que vers le néocortex et le cortex controlatéral olfactif (formant la commissure antérieure, non représentée**).** Les axones provenant de l'organe voméronasal (**VNSO)** forment le nerf voméronasal et se projettent dans le bulbe olfactif accessoire (**AOB**)**.** Les neurones de projection à partir de là envoient leurs axones vers l'**AON et** le **nLOT** astérisque (bleu**),** et vers **A** (flèches bleues **é**paisses**),** tandis que les axones des neurones de ces trois structures corticales **s**ont

projetés vers l'**AOB** (flèches bleu clair en pointillés**).** Les projections du cortex olfactif accessoire atteignent l'hypothalamus (flèche turquoise en pointillés**)** et le noyau du tractus olfactif latéral**.** Schéma tiré de (de Castro, 2009)

B. Méthodes d'exploration de la muqueuse olfactive

De grandes avancées dans la compréhension du fonctionnement de la perception olfactive ont été possibles grâce à l'utilisation de techniques d'électrophysiologie. Ces techniques ont permis de caractériser les réponses électrochimiques des neurones olfactifs en présence d'un stimulus odorant. Ces techniques d'électrophysiologie ont pris différents aspects et ont évolué au cours du temps.

1. Enregistrements de l'activité d'une population de neurones

a) Electro-olfactogrammes

Des enregistrements électrophysiologiques effectués sur l'ensemble d'un épithélium olfactif de chien en réponse à un stimulus odorant ont été effectués dès les années 1930 par deux japonais, Hosoya et Yoshida. Cela-dit, c'est à partir des années 1950 (Ottoson, 1955) que cette réponse électrophysiologique globale est étudiée en profondeur chez le lapin et est alors nommée électro-olfactogramme (EOG) (pour revue, (Scott and Scott-Johnson, 2002). L'EOG est issu de la sommation des potentiels de champ générateurs d'une population de neurones activés par une même stimulation odorante. L'augmentation de l'amplitude en réponse à l'augmentation de la concentration du stimulus peut refléter une augmentation du nombre de neurones activés tout comme l'augmentation de la réponse de neurones individuellement.

EOG en phase gazeuse

Les premières utilisations des EOG se font à partir de stimulations en phase gazeuse délivrées grâce à un olfactomètre. Cette approche découle logiquement de la modalité naturelle de dispersion des odorants. En réponse à des stimuli odorants transitoires (établis pour une seconde environ), les premières descriptions font état d'une dépolarisation transépithéliale lente de l'ordre de la seconde et d'amplitude atteignant quelques millivolts. Il a été ainsi déterminé une régionalisation de la sensibilité aux odorants chez la grenouille (Daval et al., 1970; Ottoson, 1955) et chez le rat (Mackay-Sim and Kesteven, 1994; Thommesen and Doving, 1977). C'est avec cette technique que l'importance des cils dans la réponse olfactive a été confirmée. En effet, après destruction des cils par l'application de détergents il n'y a plus de réponses EOG. Les cils sont régénérés en 2 à 3 jours et des EOG sont alors à nouveau obtenus (Bronshtein and Minor, 1977). Cette technique est toujours d'actualité et contribue encore à l'étude fonctionnelle de l'épithélium olfactif. Elle a été utilisée sur des souris KO pour la sous-unité B1b du canal CNG. Ces souris transgéniques présentent une amplitude des réponses

olfactives réduites par rapport aux souris de lignée sauvage, révélant ainsi l'implication de cette sous-unité dans la transduction du signal olfactif (Michalakis et al., 2006). Cette technique d'enregistrement a également été utilisée sur des souris KO pour la phosphodiestérase PDE1C. Etonnamment, l'absence de cette phosphodiestérase ne prolonge pas la réponse olfactive mais réduit la sensibilité et l'adaptabilité des neurones olfactifs (Cygnar and Zhao, 2009). Cette technique présente tout de même certains inconvénients. Il y a souvent une certaine rémanence des odorants s'absorbant sur les parties communes des olfactomètres. Les paramètres de stimulations comme la concentration de l'odorant qui arrive à la surface de la muqueuse sont difficiles à contrôler à cause de l'équilibre dynamique entre la phase gazeuse et condensée des odorants. La disposition relative du flux odorant et de la préparation doit être soignée, la géométrie de la stimulation étant susceptible de modifier la concentration stimulante. Le dernier point critique repose sur la viabilité de la préparation qui a tendance à s'assécher à l'air libre malgré un flux d'air humidifié.

EOG en phase aqueuse

Une technique d'enregistrement d'EOG immergé a été mise au point pour pallier à certains défauts de l'EOG classique. Cette autre approche consiste à faire s'écouler à une extrémité de la muqueuse olfactive un flux continu de solution physiologique. Ce flux laminaire, après avoir baigné la préparation est directement évacué à l'autre extrémité de la muqueuse olfactive. Les stimuli sont solubilisés et injectés dans le flux en amont de la préparation. La solubilisation des odorants permet un contrôle plus fin de la concentration des odorants qui atteignent la surface de l'épithélium olfactif. Cela a permis l'élaboration de courbes concentration/réponse et la détermination de seuils de sensibilité (Leinders-Zufall et al., 2007; Spehr et al., 2006). La solubilisation des stimuli a également permis l'application de substances pharmacologiques. Ceci a permis entre autre des avancées dans l'étude des voies de transduction dans l'épithélium olfactif avec l'emploi d'IBMX et de forskoline sur des EOG (Chen et al., 2000; Ishimaru et al., 2000). La solution physiologique qui baigne la muqueuse olfactive a pour avantage de prolonger la viabilité de la muqueuse olfactive, mais rince le mucus et permet d'émettre des réserves quant à la fidélité des conditions physiologiques.

La technique d'EOG classique ou immergée malgré son ancienneté reste une technique d'actualité. Le développement de techniques comme le *patch clamp* a pu confirmer la pertinence des enregistrements EOG. En effet, si suite à un stimulus odorant gazeux on compare la réponse obtenue en EOG à celle obtenue en *patch clamp* sur cellule entière on remarque que la sommation des potentiels générateurs recueillie à la surface de la muqueuse olfactive possède un décours temporel semblable à celui du courant entrant dans un unique neurone olfactif (Figure 11). Les deux enregistrements montrent une courbe de réponse concentration dépendante qui suit la même évolution.

L'EOG est donc bien le résultat de la sommation de réponses olfactives individuelles (Viswaprakash et al., 2009). Les EOG présentent l'avantage de rendre compte de la réponse olfactive globale de la muqueuse, en tenant compte de la sécrétion de mucus et des cellules de soutien (Lu et al., 2008). Les techniques de *patch clamp* et d'EOG apparaissent complémentaires. Ainsi, Billig et col., en 2011, utilisent l'EOG classique, l'EOG immergé et le *patch clamp* sur une lignée de souris *knock-out* pour le canal chlore activé par le calcium Anoctamin 2 (Ano2) (Billig et al., 2011). Leurs résultats bouleversent le dogme établi quant à la nécessité du canal chlore dépendant du calcium dans la réponse olfactive. Chez la souris mutante, la réponse à un mélange de 17 odorants est identique à celle de la lignée sauvage en EOG classique tandis qu'elle est réduite de 40 % en EOG immergé et réduite jusqu'à 90 % en patch clamp. Ces trois techniques *a priori* très proches apportent des résultats spécifiques.

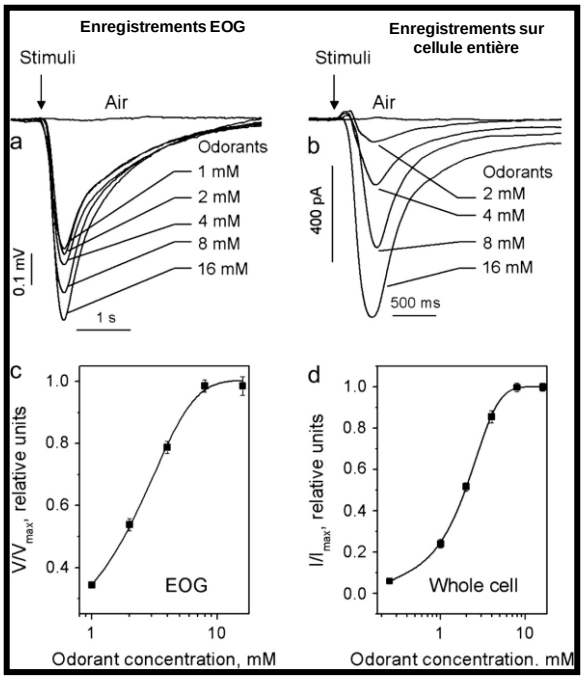


Figure 11: Comparaison des réponses olfactives obtenues à partir d'un épithélium olfactif de rat et d'un simple neurone olfactif. a : Traces d'EOG évoquées par un pulse d'air pur et d'un mélange d'odorants à différentes concentrations. **b**: Enregistrements d'un courant évoqué par un pulse d'air pur et d'un mélange d'odorants à différentes concentrations avec un potentiel maintenu à -70mV. **c** : Courbe représentant le rapport entre l'amplitude maximale de la dépolarisation en fonction de la concentration de la stimulation. **d** : Courbe représentant le rapport entre l'intensité du courant maximal en fonction de la concentration de la stimulation. La cinétique de la réponse olfactive enregistrée en EOG est proche de celle obtenue en cellule attachée. La relation de l'amplitude de la réponse avec la concentration de la stimulation est semblable dans les deux cas. Les EOG représentent donc bien une sommation de réponses olfactives unitaires d'une population de neurones. D'après (Viswaprakash et al., 2009)

2. Enregistrements électrophysiologiques unitaires

Les enregistrements électrophysiologiques unitaires consistent à enregistrer l'activité électrique spontanée ou évoquée d'un neurone olfactifs (ou de quelques neurones qui pourront être discernés les uns des autres). Pour évoquer des réponses, les stimuli majoritairement employés sont olfactifs, mais aussi mécaniques ou proprioceptifs.

a) Enregistrements extracellulaires

Gesteland, entre 1961 et 1975, a mis au point une technique d'enregistrement électrophysiologique unitaire extracellulaire. Afin d'explorer les caractéristiques individuelles des neurones olfactifs que ne permettaient pas les techniques électrophysiologiques populationnelles déjà utilisées. A l'aide de cette technique et à partir de l'épithélium olfactif d'amphibien, simple et facile d'accès, des avancées ont pu être faites quant à la relation entre l'activité de décharge de l'axone avec le potentiel champ (Gesteland et al., 1965). Il a ensuite été entrepris d'étudier la réponse de neurones olfactifs en présence de corps purs. Les stimuli odorants peuvent avoir un effet excitateur, inhibiteur ou nul sur l'activité de décharge des neurones olfactifs. Chez la grenouille, il est apparu qu'un même neurone olfactif répond fréquemment à plusieurs odorants et que chaque neurone présente un spectre de réponse spécifique (Sicard and Holley, 1984). Cette dernière constatation pourrait découler de la faible probabilité d'enregistrer avec une approche unitaire deux neurones olfactifs exprimant le même récepteur parmi un millier. Chez la souris, étudiée avec la méthode, la sélectivité des neurones récepteurs paraissait plus élevée (Sicard, 1986).Cette technique a également permis, chez le rat, d'étudier les interactions possibles entre deux corps purs de mélanges binaires (Duchamp-Viret et al., 2003). Les corps purs sont présentés seuls puis mélangés. Il en ressort trois interactions. La plus fréquente dite d'hypoadditivité où la réponse du mélange est égale à la réponse du corps pur le plus efficace. Une interaction dite de suppression, où la réponse au mélange est inférieure à la réponse du corps pur le plus efficace. Et une interaction dite de synergie, où la réponse au mélange est supérieure à la réponse au corps pur le plus efficace.

b) Enregistrements intracellulaires

Les connaissances sur les propriétés électrophysiologiques de la muqueuse olfactive ont progressées grâce au développement de techniques d'enregistrements intracellulaires. La technique de *patch-clamp* a été améliorée dans les années 1970 par Erwin Neher et Bert Sakmann (Sakmann and Neher, 1984). Elle consistait à sceller une pipette à la surface d'une membrane cellulaire et d'enregistrer des courants et des conductances, c'est ainsi qu'ils ont pu mesurer l'activité d'un seul canal récepteur à l'acétylcholine. Dans les années 1980, cette technique est utilisée dans l'étude de neurones olfactifs isolés de salamandre (Trotier, 1986) et de souris (Maue and Dionne, 1987). Des

enregistrements sont effectués en réponse à des stimulations odorantes et vont permettre de déterminer les conductances impliquées dans la réponse olfactive (Firestein and Werblin, 1989). La technique de *patch-clamp* va, à partir de là être appliquée sur des tranches d'épithélium avant d'être appliquée sur une préparation de muqueuse entière. Comparativement aux neurones isolés, cette préparation propose des conditions physiologiques améliorées. La pipette de *patch* est alors appliquée au niveau de la vésicule olfactive qui pointe à la surface de l'épithélium olfactif (Ma et al., 1999). Le *patch clamp* ne permettant d'enregistrer qu'un neurone à la fois, il est difficile d'explorer une grande quantité de neurones, il y a donc une faible probabilité d'enregistrer deux fois un neurone exprimant un même récepteur. Ce problème a trouvé une solution avec des animaux transgéniques exprimant une protéine fluorescente (GFP) sous le contrôle du promoteur du gène codant pour un récepteur d'intérêt. Les neurones olfactifs exprimant ce récepteur expriment également la GFP et sont donc fluorescents, ce qui permet de les identifier facilement. Il est alors devenu possible d'effectuer des enregistrements sur une population de neurones olfactifs exprimant le même récepteur (Grosmaitre et al., 2009).

3. Enregistrements optiques dépendants du potentiel

Une méthode d'exploration autre qu'électrophysiologique est couramment utilisée. Elle emploie des fluorophores calcium dépendants. Ces fluorophores sont chargés par la muqueuse olfactive. L'activation d'un neurone olfactif provoque une dépolarisation du neurone olfactif induite par une entrée massive d'ions calcium dans le milieu intracellulaire et conduit en présence d'un fluorophore à une hausse transitoire de l'intensité de la fluorescence (Restrepo and Teeter, 1990). Les fluorophores comme le calcium green-AM et le fluo4-AM appliqués sur une préparation de muqueuse entière sont chargés spécifiquement dans les vésicules olfactives à la surface de l'épithélium. Cette approche permet d'enregistrer les réponses de centaines de neurones simultanément en réponse à un stimulus odorant (Ma and Shepherd, 2000). Sur des préparations en tranches coronales des fluorophores tels que l'oregon green et le fura2-AM sont chargés spécifiquement dans les neurones olfactifs (Omura et al., 2003).

C. Détoxication cellulaire

Les muqueuses d'un organisme sont à l'interface entre le milieu extérieur et cet organisme. Grâce à ces interfaces, l'organisme peut effectuer des échanges de matériaux ou de signaux avec le milieu extérieur. Les échanges peuvent être gazeux comme dans le cas de la respiration ou bien liquides avec l'absorption des nutriments et l'excrétion dans le cas de la digestion. Les muqueuses ont toujours une fonction sensorielle, innervées au minimum par des fibres de la sensibilité somesthésique, sensibles,

par exemple, à l'irritation ou à la douleur. La muqueuse olfactive, ayant une fonction plus particulière, possède dans son épithélium des neurones récepteurs sensoriels à l'origine de la perception olfactive.

De par leur contact direct avec le milieu extérieur, les muqueuses subissent l'influence de l'environnement. Elles peuvent subir des agressions mécaniques par contact ou bien physiques en fonction de la température, de l'humidité ou de la sécheresse. Face à ces contraintes les épithéliums présentent un mécanisme de renouvellement fréquent de leurs populations cellulaires. Dans la muqueuse olfactive, même les neurones sensoriels sont renouvelés (Graziadei and Graziadei, 1979). La mise en évidence de neurogénèse dans le cerveau a été initiée dans les années 60 (Altman and Das, 1965) et s'est poursuivie jusque dans les années 90 (Gould and McEwen, 1993) et a mis fin au dogme sur l'absence de neurogénèse dans le cerveau des mammifères adultes datant de Ramon y Cajal (fin du XIXème siècle).

Les muqueuses sont très exposées aux substances exogènes apportées par l'environnement. Ces substances appelées xénobiotiques peuvent être d'origines diverses, tout comme elles peuvent être toxiques ou inertes. Afin de se débarrasser de ces substances potentiellement toxiques, les organismes ont mis en place un processus de détoxication qui consiste soit à directement évacuer la molécule étrangère soit à lui faire subir une transformation métabolique qui va faciliter son excrétion.

1. Principe

Le processus de détoxication implique différents enzymes et transporteurs au cours de trois étapes principales. Les deux premières étapes appelées Phase I et Phase II sont des étapes de biotransformation qui vont, d'une part, neutraliser les groupements réactifs des xénobiotiques et, d'autre part, les rendre hydrophiles afin de faciliter leur évacuation par des transporteurs membranaires et les fluides muqueux rinçant les organes exposés lors de la phase III (Figure 12).

a) Phase I

Les réactions de la phase I conduisent à une fonctionnalisation des molécules afin de les rendre moins hydrophobes. Ces molécules sont rendues plus polaires par des réactions d'oxydation, de réduction ou d'hydrolyse. Parmi ces réactions, l'oxydation est la plus rependue, elle ajoute une fonction –OH et est catalysée, entre autre, par les cytochromes P450. Les cytochromes P450 sont des monooxygénases présentes dans les cellules de soutien de l'épithélium olfactif (Dahl and Hadley, 1991).

b) Phase II

La phase II met en jeu des réactions de conjugaison. Les enzymes de la phase II vont ajouter des groupements hydrophiles sur des xénobiotiques intactes ou sur des produits de la phase I. Les principaux enzymes sont l'UDP-glucuronosyl transférase qui va ajouter un acide glucuronique. Cet enzyme a une faible affinité pour leur substrat mais une grande capacité (Negishi et al., 2001). A l'inverse de la sulfotransférase qui va ajouter un groupement sulfate qui a une forte affinité pour son substrat mais une faible capacité de conjugaison. On trouve d'autres enzymes comme la glutathion-S-transférase qui va conjuguer le xénobiotique avec un glutathion. La O-,N-,S-méthyl transférase qui va ajouter un groupement méthyl et la N-acéthyltransférase qui va ajouter un groupement acétyl. Les molécules rendues hydrophiles vont pouvoir être prises en charge plus facilement par les protéines d'efflux de la phase III.

c) Phase III

La phase III de détoxication consiste en l'évacuation des xénobiotiques intacts ou conjugués à travers la membrane plasmique par des transporteurs transmembranaires. L'évacuation peut se faire du coté apical de la cellule vers la lumière intestinale par exemple qui aboutira à une excrétion fécale. L'évacuation peut également se faire du côté basal de la cellule, vers le sang, qui aboutira à une excrétion rénale. Cette évacuation est un transport actif qui nécessite un apport d'énergie via l'hydrolyse d'ATP. Les transporteurs impliqués font partie de la superfamille des protéines avec une région de fixation à l'ATP (ATP-binding cassette, ABC). Ces transporteurs ont une large gamme de substrats et sont à l'origine du phénomène de résistance pléiotropique.

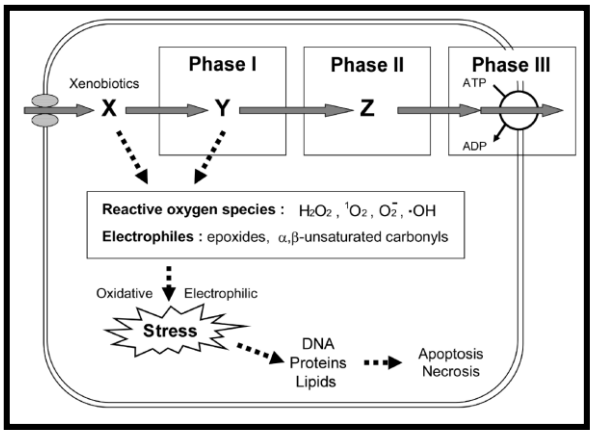


Figure 12: Représentation schématique de la détoxication cellulaire. Le métabolisme des xénobiotiques s'effectue en trois phases. Une phase I de fonctionnalisation, une phase II de conjugaison et une phase III de transport. Les composés toxiques peuvent engendrer un stress oxydatif ou électrophile qui vont provoquer la mort cellulaire. D'après (Toyoda et al., 2008)

D. La résistance pléiotropique

1. Principe

La résistance pléiotropique est aussi appelée résistance à de multiples drogues (MDR). Elle a été mise en évidence la première fois par Bielder et Riehm en 1970 en montrant qu'une lignée cellulaire rendue résistante à l'actinomycine D par une exposition prolongée acquérait par la même occasion une résistance à d'autres substances pharmacologiques bien différentes (Biedler and Riehm, 1970). La résistance pléiotropique offre donc une résistance croisée à un spectre très large de substances pharmacologiques. Ce phénomène est largement étudié dans l'élaboration de traitements anticancéreux puisqu'il est à l'origine de l'échec de nombreux agents chimio thérapeutiques. Ces agents ont pour mode d'action une induction de l'apoptose ou de la nécrose des cellules cancéreuses. Cette résistance peut être endogène chez certaines cellules mais peut aussi être induite par la présence des agents chimiothérapeutiques. Dans ce cas il y a une adaptation qui peut s'opérer à différents niveaux (Stavrovskaya, 2000) :

- Diminution de l'influx et augmentation de l'efflux des substances pharmacologiques, ce qui induit une faible accumulation de ces substances dans le milieu intracellulaire. Exemple : par surexpression des transporteurs.
- Neutralisation de la substance pharmacologique par l'activation des mécanismes de détoxification. Exemple : par séquestration de la substance dans des vésicules.
- Altération de la cible de la substance pharmacologique. Exemple : par mutation d'un gène.
- Diminution des dommages causés par la substance pharmacologique. Exemple : par l'augmentation des mécanismes de réparation de l'ADN.
- Arrêt du cycle cellulaire et/ou blocage de la mort cellulaire. Exemple : par altération des gènes contrôlant l'apoptose.

2. Famille des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC forment une superfamille de protéines. On retrouve ces transporteurs de la bactérie aux plantes en passant par l'Homme. Chez l'Homme on compte actuellement 49 membres répartis dans 7 sous-familles dénommées ABCA à ABCG. Un transporteur ABC « type » est composé de deux domaines transmembranaires (*transmembrane domain*=TMD) constitués chacun de 6 hélices

α et de deux domaines de fixation de l'ATP (*Nuclear Binding Domain*=NBD) (Figure 13). Sur chaque NBD on retrouve trois séquences de nucléotides conservées au sein de la famille ABC. Une séquence appelée Walker A qui est impliquée dans la fixation l'ATP β-phosphate, une séquence appelée Walker B impliquée dans la fixation de Mg^{2+} et une séquence appelée signature ABC ou motif C qui est impliquée dans la reconnaissance, la fixation et l'hydrolyse de l'ATP . La plupart de ces transporteurs réalisent un transport actif à travers la membrane cellulaire grâce à un apport d'énergie en provenance de l'hydrolyse d'ATP. Les substrats de ces transporteurs sont très variés, ils peuvent être des acides aminés, des ions, des lipides, des substances pharmacologiques, des sucres, des peptides, des hormones ou bien des xénobiotiques. Ces transporteurs sont exprimés dans de nombreuses régions de l'organisme en particulier au niveau des barrières pharmacologiques comme la barrière hémato-encéphalique, l'intestin, le foie et le rein. Cette localisation met en évidence le rôle de certains transporteurs ABC dans la résistance à des substances pharmacologiques (Ueda, 2011).

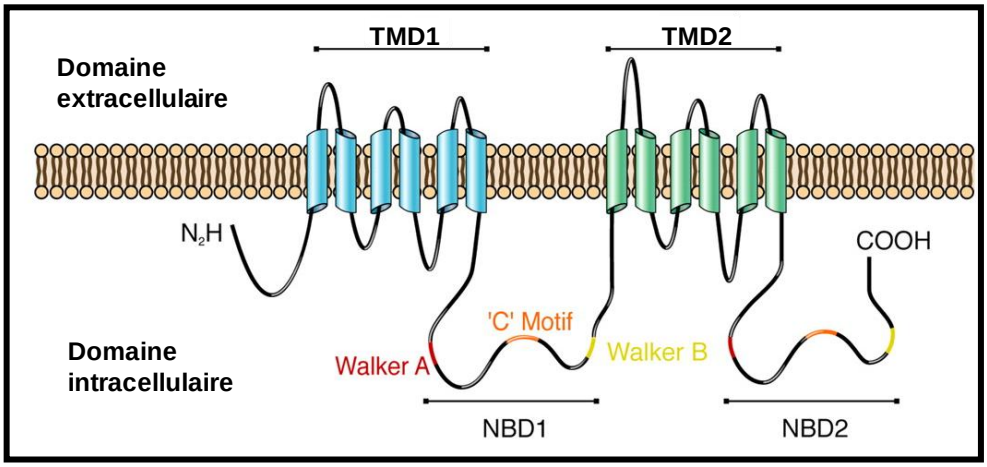


Figure 13: Représentation schématique de la structure « type » des transporteurs ABC. Le transporteur ABC « type » est composé de deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2) composés chacun de 6 hélices α et de deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD) qui contiennent les motifs *walker* A, B et le motif C conservés au sein de la famille ABC. D'après (Deeley et al., 2006)

3. *Transporteurs impliqués dans la résistance pléiotropique*

Treize transporteurs ABC impliqués dans des phénomènes de résistance à des substances pharmacologiques ont été identifiés (Gillet et al., 2007). Ces 13 transporteurs se répartissent dans quatre sous-familles. Il y a un transporteur de la sous-famille ABCA, l'ABCA1. Quatre transporteurs de la sous-famille ABCB. ABCB1, appelée aussi P-glycoprotéine (P-gp) ou « *multidrug resistance 1* » (MDR1), ABCB4 appelée aussi MDR2 et ABCB11 appelée également « *bile salt export pump* » (BSEP) ou « sister-P-glycoprotéine » (sP-gp). On compte huit transporteurs issus de la famille ABCC.

Les ABCC1 à 6 , ABCC11 et ABCC12, aussi appelées « *multidrug resistance-assossiated proteins* » (MRP). On trouve un unique membre de la famille ABCG, la ABCG2 également appelée « *breast cancer resistance protein* » (BCRP). Parmi ces 15 protéines, la P-gp, la MRP1 et la BCRP sont les plus largement étudiées. P-gp et MRP1 sont reconnus pour être les principaux contributeurs au phénomène de résistance pléiotropique.

4. P-gp/MDR1

a) Découverte

En 1976, Juliano et Ling identifient une glycoprotéine de surface de 170 KDa dans la membrane d'une lignée de cellules ovariennes de Hamster chinois (CHO) sélectionnée pour sa résistance à la colchicine (Juliano and Ling, 1976). Cette lignée présente une diminution de perméabilité membranaire pour différentes substances pharmacologiques par rapport à la lignée sauvage qui ne présente pas cette glycoprotéine. Cette glycoprotéine sera ensuite appelée glycoprotéine-perméase (P-gp). Les études qui suivront permettront de mieux connaître la nature de la P-gp, de révéler son implication dans de nombreux phénomènes de résistance pléiotropique et aussi de montrer son expression naturelle dans des tissus non tumoraux (Gottesman and Pastan, 1993).

b) Propriétés du transporteur

La P-gp est une glycoprotéine transmembranaire de 170 KDa. Elle a la structure type de la famille ABC, c'est-à-dire qu'elle possède deux TMD de 6 hélices α chacun et de deux NBD (Figure 13). Les deux TMD dans leur conformation 3D forment un pore à travers la membrane tandis que les deux NBD se situent dans le milieu intracellulaire.

La P-gp fonctionne comme une pompe qui rejette vers le milieu extérieur des substances contre leur gradient de concentration grâce à l'apport d'énergie en provenance de l'hydrolyse de molécules d'ATP. Trois mécanismes d'efflux sont envisagés. Le premier consiste en l'évacuation du cytosol vers le milieu extérieur à travers le canal de la protéine des substances ayant traversé la membrane passivement. Le deuxième mécanisme consiste en un phénomène de « flip-flop » des substances hydrophobes du feuillet interne de la membrane plasmique vers le feuillet externe où elles diffuseront passivement vers le milieu extérieur. Le troisième mécanisme est une combinaison des deux premiers. Les substances lipophiles sont récupérées dans la membrane plasmique avant qu'elles n'atteignent le cytosol et sont évacuées par le canal de la protéine (Varma et al., 2003).

Les tests pharmacologiques d'agents anticancéreux sur des lignées cellulaires développant une résistance pléiotropique par induction ou bien par une surexpression de P-gp ont mis en évidence une

très grande variété de substrats pour celle-ci. Le principal point commun entre ces divers substrats est qu'ils sont surtout hydrophobes, de petite taille (entre 250 Da et 1900 Da) et chargés positivement. Les substrats de la P-gp ne sont pas préalablement transformés par le métabolisme de détoxication. On peut distinguer au moins cinq classes de substrats, les bases faibles lipophiles, les cations lipophiles, les composés neutres polycycliques, les molécules amphiphiles et les peptides hydrophobes (Ferte, 2000).

c) Localisation et rôle physiologique

La P-gp ou MDR1 est le premier membre de la sous famille B des transporteurs ABC. Elle est codée par le gène ABCB1 chez l'Homme. Chez les rongeurs, ce gène existe sous deux isoformes, Abcb1a et Abcb1b ou Mdr1a et Mdr1b. Les deux protéines issues de ces isoformes partagent 85 % d'homologie entre elles et plus de 80 % avec la protéine humaine. Ces trois protéines présentent le même spectre de substrats issus des agents anti-cancéreux. Bien que la localisation de l'expression de Mdr1a et b diffère, communément elles sont exprimées de façon similaire à MDR1, l'orthologue humaine. Ceci permet de supposer que la protéine humaine et ses deux isoformes présentes chez les rongeurs assurent les mêmes fonctions physiologiques (Schinkel, 1997).

Protéine	Espèce	Gène et synonymes
MDR1, P-gp	Homme	ABCB1, MDR1, P-GP, PGY1, ABC20, CD243, CLCS, GP170, MGC163296
	Rat/Souris	Abcb1a, Mdr1a, mdr-3, P-gp, Pgy-3, Evi32
		Abcb1b, Abcb1, mdr, Mdr1, Mdr1b, Pgy-1
MRP1	Homme	ABCC1, ABCC, MRP, MRP1, GS-X, ABC29, DKFZp686N04233, DKFZp781G125
	Rat/Souris	Abcc1, Abcc1a, Abcc1b, MRP, Mrp1, Mdrap

Tableau 1: Nomenclature et synonymes des gènes codant pour les protéines MDR1 et MRP1 chez l'Homme et leurs orthologues chez la Souris et le Rat.

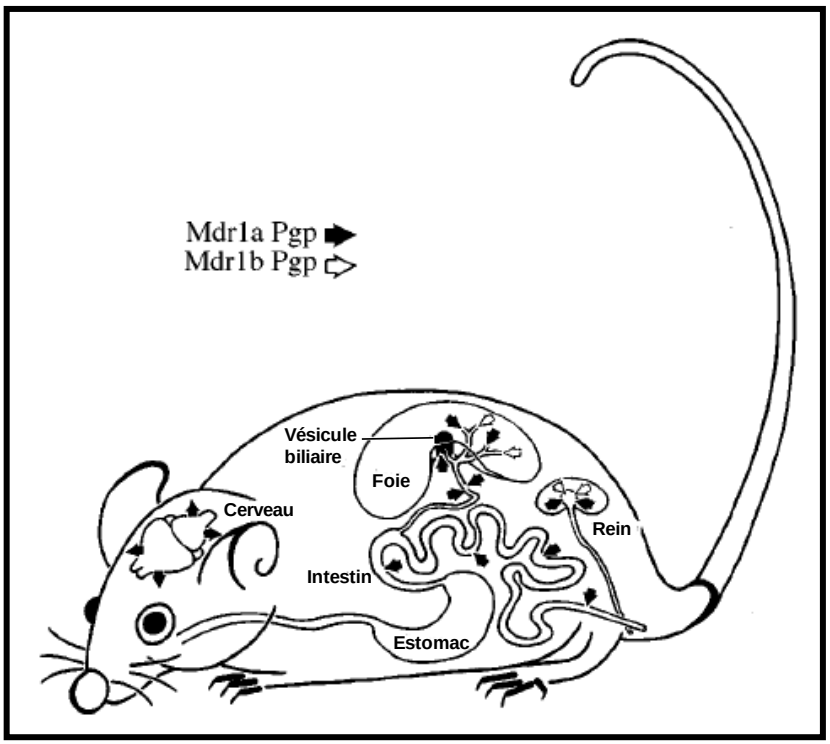


Figure 14: Illustration des principales localisations physiologiques de P-gp Mdr1a et P-gp Mdr1b chez la souris. Les flèches représentent la contribution des deux protéines à l'exclusion et à l'extrusion de substances pharmacologiques des principaux organes. D'après (Schinkel, 1997)

Le rôle principal de la P-gp est la protection de l'organisme contre les toxines. Elle est exprimée du coté apical de cellules d'épithélium de différents organes excréteurs tels l'intestin, le foie, le rein, le pancréas, le poumon et aussi au niveau de barrières pharmacologiques telles que la barrière hémato-encéphalique et les capillaires des testicules. Les souris transgéniques KO pour Mdr1a et Mdr1b sont parfaitement viables et ne présentent aucune altération physiologique visible. Elles sont par contre beaucoup plus sensibles aux xénobiotiques. On trouve une augmentation de l'accumulation de substances pharmacologiques dans le cerveau et une diminution dans les fèces. Le rôle de P-gp n'est donc pas essentiel à la viabilité des individus mais peut être un facteur déterminant dans la survie.

D'autres fonctions sont évoquées. La P-gp semble être impliquée dans le transport de lipides, le métabolisme du cholestérol, dans la régulation du volume cellulaire, dans le système immunitaire, dans la mort et la différenciation cellulaire et dans le transport hormonal (Johnstone et al., 2000; Schinkel, 1997).

Mdr1a est exprimé dans plusieurs régions du cerveau chez le rat comme le bulbe olfactif, le cortex frontal, dorsal, l'hippocampe, le mésencéphale, le tronc cérébral et le cervelet (Kwan et al., 2003).

Mdr1b par contre semble exprimé à un niveau détectable par RT-PCR uniquement dans l'hippocampe. Mdr1a est déjà exprimé dans le cerveau de souris dès le 16ème jour prénatal. Son niveau d'expression est démultiplié entre le jour 0 et l'âge adulte (Tsai et al., 2002).

5. *Mrp1*

a) *Découverte*

A la fin des années 70 et au début des années 80, la résistance pléiotropique, étudiée à partir de lignées cellulaires sélectionnées pharmacologiquement ou de cellules cancéreuses, était considérée comme exclusivement due à la P-gp. La recherche d'autres protéines conférant le phénotype de résistance pléiotropique s'est développée vers la fin des années 80 avec l'observation de lignées cellulaires présentant une résistance à de multiples drogues sans surexpression de P-gp. Ces observations furent effectuées en particulier à partir d'une lignée cellulaire cancéreuses du poumon issue de l'Homme (H69AR) (Mirski et al., 1987). C'est en 1992 qu'est identifié le gène exprimant la protéine à l'origine de la résistance aux multiples drogues des lignées H69R (Cole et al., 1992). Cette protéine est appelée MRP pour « *Multidrug-resistance-related protein* ».

b) *Propriétés du transporteur*

MRP1 est une glycoprotéine intégralement membranaire de 190KDa. Elle effectue un transport actif de substances à l'encontre de leur gradient de concentration. L'énergie nécessaire au transport provient de l'hydrolyse de molécules d'ATP.

MRP1 ne présente pas la structure typique des transporteurs ABC. Elle possède les motifs Walker A, B et la signature ABC sur deux NBD mais les deux NBD ne sont pas identiques comme pour la P-gp. Elle possède trois domaines transmembranaires au lieu de deux, constitués respectivement de 5, 6 et 6 hélices α (Figure 15).

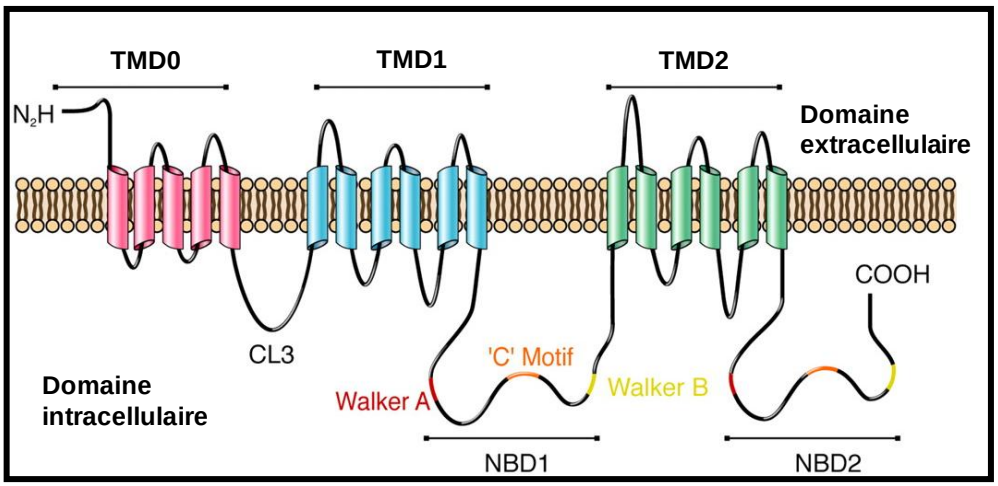


Figure 15: Structure schématique de MRP1. MRP1 possède trois domaines transmembranaires (TMD0, TMD1 et TMD2) composés respectivement de 5, 6 et 6 hélices α, et de deux domaines de fixation des nucléotides caractéristiques de la famille ABC. D'après (Deeley et al., 2006)

Les études pharmacologiques ont montré que MRP1 présente un large spectre de substrats. Comme pour la P-gp ce sont généralement des composés hydrophobes, anioniques et non conjugués. En plus de ces substrats, MRP1 est capable de transporter des anions organiques endogènes et des composés conjugués issus du métabolisme des xénobiotiques tels que les glutathions, les glucuronates et les sulfates.

c) Localisation et rôle physiologique

MRP1 est le premier membre de la sous-famille C des transporteurs ABC. Elle a été appelée MRP dans un premier temps avant la découverte d'autres membres de la même sous-famille. Elle correspond au transporteur GS-X pour « *glutathion conjugate pump* » décrit bien avant la découverte de MRP1. Les orthologues de MRP1 chez les Rongeurs et l'Homme partagent 88 % d'identité mais ont un spectre de substrats qui diffère (Nunoya et al., 2003).

MRP1 est exprimé dans une très grande variété de tissus incluant la peau, les tissus conjonctifs et le cœur (Flens et al., 1996). Comme pour P-gp, MRP1 est fortement exprimé dans des tissus fortement impliqués dans les échanges avec le milieu extérieur et les principales barrières pharmacologiques. Dans ces tissus, MRP1 est généralement exprimé du côté basal de cellules polarisées au sein d'un épithélium sauf dans les capillaires de la barrière hémato-encéphalique où elle exprimée du coté apical. On retrouve donc MRP1 en grande quantité dans le poumon, le rein, le placenta, la barrière hémato-encéphalique, la barrière hémato-liquide cérébrospinal et la barrière hémato-testiculaire. Le foie est fortement impliqué dans les processus de détoxication mais il n'exprime que faiblement

MRP1. Par contre, MRP1 est fortement exprimé après lésion dans les cellules progénitrices hépatiques (Ros et al., 2003).

Cette localisation tissulaire de MRP1 et ses substrats suggèrent une implication de MRP1 dans la protection de cellules spécifiques contre les xénobiotiques et les métabolites toxiques endogènes. Ceci est confirmé par une hypersensibilité aux composés toxiques de souris transgéniques KO pour le gène codant pour MRP1 (Wijnholds et al., 1997).

Bien que les souris MRP1$^{-/-}$ soient parfaitement viables, en bonne santé, fertile et présentant des paramètres hématologiques et histologiques normaux, la MRP1 est impliquée dans fonctions physiologique autre que la protection cellulaire. En effet, les souris MRP1$^{-/-}$ présentent également une diminution de la réponse inflammatoire. Cela s'explique par le fait que le leukotriène C_4 (LTC_4) est un substrat de MRP1 (Leier et al., 1994b). LTC_4 est impliqué dans la réponse inflammatoire. Il est synthétisé dans des cellules sécrétrices de leukotriènes comme les macrophages ou les cellules dendritiques. LTC_4 est obtenu par la conjugaison de LTA_4 avec un glutathion avant d'être excrété dans le sang.

6. Expression de MDR1 et de MRP1 dans le tissu olfactif

Des études fonctionnelles mettent évidence la présence de P-gp et de MRP1dans l'épithélium olfactif, notamment Manzini et col. qui ont mis en évidence la présence et l'activité de P-gp et de MRP1 dans l'épithélium olfactif de têtard de Xénope (Manzini and Schild, 2003). A partir de tranches de la cavité nasale, ils ont montré que le chargement de fluorophores tels que Calcium green-AM, Fura2-AM, calcéine-AM et Fura red-AM par la muqueuse olfactive était fortement amélioré lorsque l'incubation s'effectuait en présence de bloqueurs spécifiques de P-gp et de MRP1. Par immunocytochimie, ils localisent P-gp du coté basal de la muqueuse olfactive. A partir des effets des bloqueurs spécifiques et du marquage immunocytochimique, ils affirment que P-gp et MRP1 sont exprimés par les neurones olfactifs chez le Xénope.

Chez la souris, Graff et Pollack ont montré avec un substrat et un inhibiteur spécifique de P-gp que la muqueuse olfactive est une barrière pharmacologique (Graff and Pollack, 2005). Ils ont confirmé l'implication de P-gp dans cette résistance avec des souris transgéniques KO pour Mdr1a qui présentent le même niveau d'accumulation de [$^{-}$3]-vérapamil, administré par voie nasale, dans le cerveau en présence et l'absence d'inhibiteur de P-gp. Par immunofluorescence sur des tranches de la cavité nasale, ils ont localisé P-gp principalement dans les cellules de soutien de la muqueuse olfactive.

Kandimalla et Donovan ont étudié le transport de la chlorpheniramine et de la chlorcyclizine à travers la muqueuse nasale de bovin in vitro (Kandimalla and Donovan, 2005b). Ces substances pharmacologiques sont capables de traverser la barrière hémato-encéphalique. Si elles sont administrées par voir nasales elles n'aboutissent pas dans le système nerveux central. Kandimalla et Donovan ont mis en évidence que le transport de ces deux substances se fait surtout de la sous-muqueuse vers muqueuse, que ce transport est actif et qu'il peut être modulé par des inhibiteurs de MRP1 et de P-gp. Ils confirmeront ensuite la présence de P-gp dans la muqueuse olfactive de bovin en étudiant le transport de l'étoposide (Kandimalla and Donovan, 2005a). Ce transport est modulé par des inhibiteurs spécifiques de P-gp mais pas de MRP1. Par immunohistochimie, ils localisent P-gp du côté apical de la muqueuse olfactive, dans la sous-muqueuse des épithéliums olfactifs et respiratoires ainsi que dans les glandes de la cavité nasale. Ils confirment ainsi la fonction de P-gp comme facteur influençant le transport de substances pharmacologiques du nez vers le cerveau.

D'autres études non fonctionnelles mettent évidence la présence de MRP1 et de P-gp dans l'épithélium olfactif. Chez le rat adulte, Kudo et col., 2010, ont mis en évidence l'expression de MRP1 dans la cavité nasale en extrayant l'ARN messager présent dans le tissu et en effectuant une RT-PCR (Kudo et al., 2010). Par hybridation in situ, ils ont localisé MRP1 dans l'épithélium olfactif mais pas dans l'épithélium respiratoire. Ils ont observé MRP1 principalement dans la partie supranucléaire des cellules de soutien et une partie des neurones olfactifs présents à mi-épaisseur de l'épithélium. Par une double immunofluorescence sur des tranches histologiques, ils n'observent pas de co-localisation de MRP1 et OMP mais ne concluent pas catégoriquement quant à la présence ou l'absence de MRP1 dans les neurones olfactifs.

Genter et col. ont mesuré le niveau d'expression de MRP1 par une technique d'ADN branché dans plusieurs tissus chez le rat (Genter et al., 2010). Dans l'ensemble de l'épithélium nasal MRP1 est exprimé jusqu'à deux fois plus que dans le rein, mais jusqu'à deux fois moins que dans le bulbe olfactif. L'expression de MRP1 dans le foie est très faible. Par immunohistochimie sur des tranches de la cavité nasale, ils obtiennent une réactivité diffuse dans l'épithélium olfactif avec quelques noyaux de neurones olfactifs fortement marqués. L'épithélium respiratoire quant à lui présente un fort marquage nucléaire.

Mayer et col. ont utilisé une technique d'extraction des cils de neurones olfactifs qui améliore la pureté des échantillons et qui augmente la fiabilité des interprétations par rapport aux études précédentes (Mayer et al., 2009). Parmi les 377 protéines identifiées, ils trouvent MRP1 mais n'évoquent pas P-gp. En extrayant l'ARNm des cornets chez le rat, Thiebaud et col. ont mis en

évidence l'expression de Mdr1a et de Mrp1dans l'épithélium nasal tandis que Mdr1b est exprimé à un niveau à peine détectable (Thiebaud et al., 2010).

7. Modulateurs du transport effectué par MDR1 et MRP1

La recherche d'inhibiteurs de l'activité de transport des protéines associées à la résistance pléiotropique est un axe important dans la mise au point de traitements anticancéreux. En effet, afin que les agents pharmacologiques puissent être efficaces ils doivent pouvoir atteindre leur cible et doivent pour cela traverser certaines barrières pharmacologiques de l'organisme et/ou passer outre la résistance aux multiples drogues intrinsèque ou induite de certains types cellulaires sains ou cancéreux. Le blocage des transporteurs doit permettre aux substances pharmacologiques de s'accumuler dans leur cellule cible (Figure 16). En plus des intérêts cliniques, l'identification d'inhibiteurs efficaces et spécifiques aux différents transporteurs ABC permet d'en étudier la localisation tissulaire, les mécanismes du transport et les fonctions physiologiques dans lesquelles ils sont impliqués.

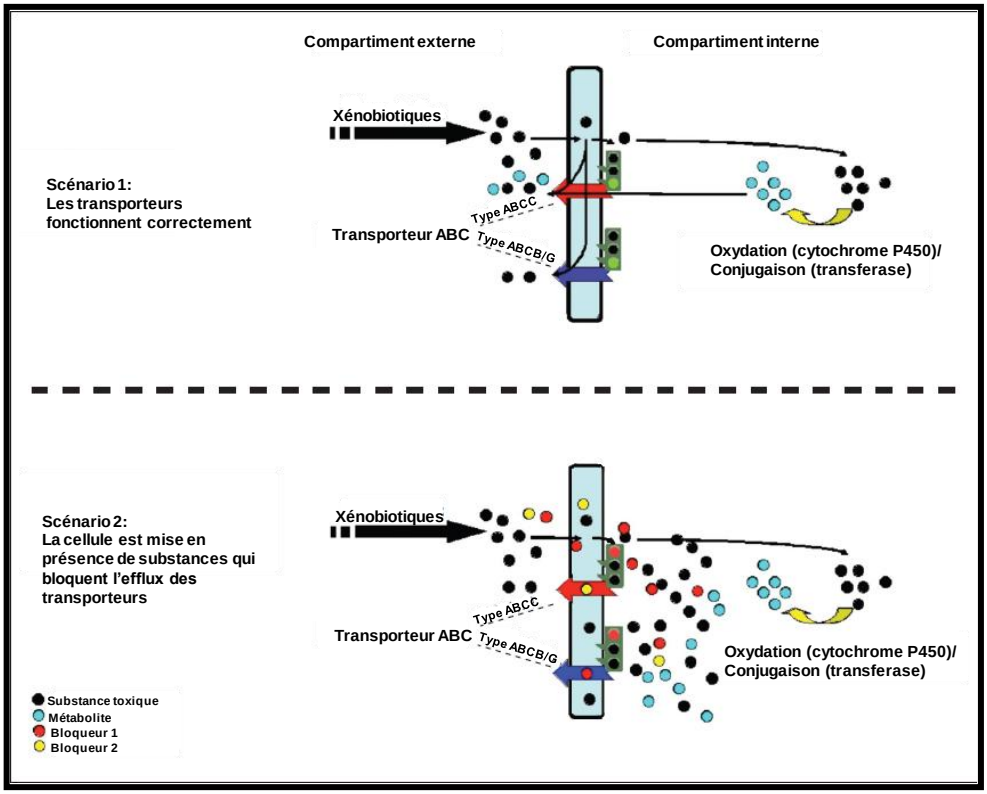


Figure 16: Schéma représentant les mécanisme de transport dans une cellule. Dans le scénario 1, peu de xénobiotiques entrent dans la cellule, ceux qui y parviennent sont modifiés par oxydation et conjugaison via les phases I et II du métabolisme de détoxication et évacués ensuite. Dans le scénario 2, des substances bloquent les transporteurs de type

ABCC (ex : MRP1) et ABCB (ex : P-gp). Cela permet aux xénobiotiques appliqués simultanément de pénétrer dans la cellule et de s'y accumuler. D'après (Epel et al., 2008)

L'activité des transporteurs ABC peut être inhibée par une altération du mécanisme de reconnaissance et de fixation du substrat, ou bien par une altération de son activité ATPasique. Dans le cas de la P-gp une altération des propriétés de la bicouche lipidique de la membrane plasmique peut altérer l'efflux réalisé par la protéine. En général les inhibiteurs vont interagir avec le transporteur au niveau des sites de fixation des substrats et des molécules d'ATP (Litman et al., 1997).

a) Modulateurs spécifiques de MDR1

Vérapamil

Le vérapamil est une des premières substances pharmacologiques utilisées pour augmenter la cytotoxicité de composés anticancéreux tels que les Vinca alkaloids vincristine et vinblastine (Tsuruo et al., 1981). Comme la plupart des modulateurs de P-gp de première génération son effet d'inhibition de la résistance aux multiples drogues est un effet secondaire. Le vérapamil est à l'origine utilisé comme vasodilatateur coronarien et est prescrit dans certains cas d'hypertension. Il agit principalement en bloquant les canaux calciques de type L dépendant du potentiel. Il est utilisé classiquement comme un bloqueur spécifique de P-gp (Fujita et al., 1997).

Cyclosporine A

Comme le vérapamil, la cyclosporine A est un inhibiteur de la résistance pléiotropique de première génération. Elle est utilisée depuis le début des années 80 pour ses propriétés d'inhibition de la prolifération de lymphocytes T et est prescrite comme immunodépresseur dans les cas de greffes. Ses propriétés d'inhibition de la résistance aux multiples drogues sont connues depuis la fin des années 80 (Twentyman, 1992) et elle est utilisée classiquement comme inhibiteur spécifique de P-gp (Legrand et al., 1998).

b) Modulateurs spécifiques de MRP1

Probénécide

Le probénécide a été mis au point dans les années 50 pour diminuer l'excrétion des antibiotiques au niveau du rein. Cette utilisation sera délaissée dans les années 60. Le probénécide facilite l'excrétion de l'acide urique et va donc être prescrit dans les traitements contre la goutte. Dans les années 80 on remarque qu'il permet de réduire la fuite du Fura-2 du milieu intracellulaire (Merritt et

al., 1990). Il sera donc fréquemment utilisé dans les études sur le calcium intracellulaire. C'est au cours des années 90 qu'il sera identifié comme inhibiteur spécifique de MRP (Evers et al., 1996) et utilisé classiquement (Legrand et al., 1998).

MK571

Le MK571 est un analogue de leukotriènes antagoniste du récepteur aux leukotriènes D4 (LTD4). Son inhibition de MRP a été mis en évidence dans les années 90 (Gekeler et al., 1995; Leier et al., 1994a). Il est utilisé depuis classiquement comme inhibiteur spécifique de MRP1 (Luders et al., 2009).

E. Techniques d'étude de MDR1 et de MRP1

La mise en évidence de MDR1 et de MRP1 peut se faire via l'activité excrétrice de ces transporteurs grâce à l'utilisation de substrats et d'inhibiteurs spécifiques. Elle peut également se faire par des techniques de biologie moléculaire dérivées de la PCR qui permettent de révéler et de quantifier l'expression de Mdr1et de Mrp1 dans un tissu ou un type cellulaire donné. Ces deux approches peuvent être complémentaires. La première apporte une information sur l'aspect fonctionnel du transporteur et la seconde permet de confirmer sa nature. Ces études peuvent être couplées à de l'immunohistochimie pour déterminer la localisation cellulaire des transporteurs.

1. Techniques de mise en évidence fonctionnelle

a) Substances radiomarquées

L'étude de MDR1 et de MRP1 a commencée par l'utilisation de substances marquées radioactivement par du tritium ou du carbone 14. Par exemple, Harker et Sikic en 1985 utilisent la [^{3}H] daunorubicin et la [^{14}C] doxorubicin pour étudier leur transport par une lignée cellulaire présentant une résistance pléiotropique induite par une exposition à la doxorubicin. La technique consiste à incuber les cellules en présence des substances radiomarquées et à rincer le milieu après un temps déterminé. Une solution de scintillation est ajoutée. Cette solution émet de la fluorescence en présence de radioactivité. Le système permet d'évaluer l'incorporation des substances radioactives par les cellules étudiées (Harker and Sikic, 1985).

L'emplois de substances radioactives est toujours d'actualité. Sasabe et col. (2004) notamment avec la [^{14}C] GFPX, un antibiotique de type quinolone. A l'aide de souris transgéniques Mdr1a$^{-/-}$, Mdr1b$^{-/-}$ et Mrp1$^{-/-}$ ils ont comparé avec une ligné de type sauvage la répartition de la substance radiomarquée après injection par voie intraveineuse au niveau de l'artère de la queue. Ils ont mesuré la radioactivité dans différents tissus, préalablement lysés, à l'aide d'une solution de scintillation et de la

mesure de la fluorescence avec un fluorimètre. Ils ont aussi mesuré la présence de l'isotope dans le plasma. Il en résulte une augmentation de [^{14}C] GFPX dans la trachée, le cœur, le rein, la rate et la graisse brune chez les souris mrp1$^{-/-}$, tandis que chez les souris Mdr1a$^{-/-}$, Mdr1b$^{-/-}$ ils n'observent la même augmentation que dans le cerveau. [^{14}C] GFPX se trouve aussi en plus grande quantité dans le plasma chez les souris Mdr1a$^{-/-}$, Mdr1b$^{-/-}$ comparée à la lignée sauvage, à l'inverse des souris Mrp1$^{-/-}$ qui présentent un niveau identique. La mise en évidence de l'activité de MDR1 et de MRP1 dans divers tissus sains et dans des conditions physiologiques apporte d'intéressantes informations pour l'étude fonctionnelle de ces transporteurs (Sasabe et al., 2004).

b) Substances fluorescentes

L'utilisation de substances radiomarquées présente des contraintes techniques notamment dû à la manipulation de radio-isotopes. Elle ne permet pas non plus d'observer la distribution cellulaire ou tissulaire des substances incorporées. C'est pourquoi, Alexander A. Neyfakh en 1988 a étudié la possibilité d'utiliser 18 substances fluorescentes pour l'étude de la résistance pléiotropique (Neyfakh, 1988). Ces 18 substances étaient déjà utilisées pour effectuer du marquage cellulaire. Par une technique de microscopie avec fluorescence et plusieurs lignées cellulaires résistantes, il a montré que la Rhodamine 123 et la *berberin* s'accumulent dans les mitochondries des cellules saines tandis qu'il n'y a pas d'accumulation dans les cellules résistantes. Les 16 autres substances fluorescentes s'accumulent dans les deux types cellulaires mais plus faiblement dans les cellules résistantes. Cette différence d'accumulation peut être abolie en présence d'inhibiteurs de la résistance pléiotropique tel que le vérapamil. Cet effet des inhibiteurs apparaît réversible puisqu'un efflux de Rhodamine 123 est observé avec les cellules résistantes lorsque l'inhibiteur est retiré.

Il s'en est suivi des études afin de déterminer le choix d'une substance fluorescente la plus pertinente possible. Les études se sont principalement portées sur la Rhodamine 123 (Canitrot and Lautier, 1995), la calcéine-AM (Hollo et al., 1994), le Fura2-AM (Di Virgilio et al., 1990) et autres dérivés estérifiés par l'acétoxy méthyl.

La rhodamine 123 est une substance fluorescente qui, dans les cellules, a un spectre d'absorption maximal vers 520 nm et un spectre d'émission maximal vers 535 nm. Elle marque spécifiquement les mitochondries. Le Fura2-AM est une substance rendue lipophile par un groupement acétoxyméthyl. Dans le milieu intracellulaire il y a des estérases qui clivent ce groupement AM. Le Fura2 se retrouve sous forme d'un acide hydrophile fluorescent. Il possède un spectre d'excitation à 340 nm lorsqu'il est libre et à 380 nm lorsqu'il interagit avec les ions Ca^{2+}. Dans les deux cas elle a un spectre d'émission maximal à 510 nm. L'intensité de la fluorescence avec Fura2-AM varie en fonction de la

concentration intracellulaire de Ca^{2+} et peut être influencée par le pH. La calcéine-AM, comme le Fura2-AM est une substance lipophile qui va être piégée à l'intérieur de la cellule après hydrolyse du groupement AM. Elle n'est fluorescente que sous sa forme d'acide. Contrairement au Fura2-AM la fluorescence de la calcéine-AM n'est ni influencée par le pH ni par la concentration intracellulaire d'ions Ca^{2+}, ce qui en fait un bon marqueur pour les études quantitatives sur le marquage cellulaire (Lebedeva et al., 2011). Elle a un spectre d'absorption maximal à 480 nm et un spectre d'émission maximal à 520 nm. La rhodamine 123, le Fura2-AM et la calcéine-AM présentent un fort rendement quantique de fluorescence, les rendant particulièrement appropriées pour des techniques telles que la cytométrie en flux.

Des études ont portés sur la pertinence du choix du marqueur fluorescent pour mettre en évidence l'activité de MDR1 et de MRP1. Ainsi, Homolya et col. (1993) ont montré sur une lignée cellulaire NIH-3T3 transfectée avec le gène de MDR1 humaine que c'est sous la forme AM que sont transportées les sondes fluorescentes telles que Fura2-AM, Fluo3-AM et calcéine-AM par la P-gp (Homolya et al., 1993). Avec la découverte de l'implication de MRP1 dans la résistance aux multiples drogues, des études ont cherché à déterminer la spécificité des sondes fluorescentes. Ainsi, Feller et col. en 1995 ont utilisé des lignées cellulaires sur-exprimant soit MDR1 soit MRP1 (Feller et al., 1995b). Dans les cellules surexprimant MDR1, l'application d'un bloqueur spécifique de MDR1 améliore le chargement de rhodamine 123 et de calcéine. Dans les cellules surexprimant MRP1, l'application d'un bloqueur spécifique de MRP1 n'améliore l'accumulation que de calcéine. L'efflux de calcéine sous sa forme d'acide libre peut être modulé avec des inhibiteurs spécifiques de MRP1. Ces résultats sont confirmés entre autre par Dogan et col. en utilisant des lignées cellulaires avec des niveaux d'expression différents de MDR1 et de MRP1 ainsi que des inhibiteurs spécifiques tels que la cyclosporine A, probénécide et MK571 (Dogan et al., 2004). Il en résulte que la rhodamine 123 est un bon marqueur spécifique pour l'étude de MDR1, tandis que calcéine-AM permet l'étude de MDR1 et plus spécifiquement de MRP1. Sur une préparation en tranche de la muqueuse olfactive du têtard de Xénope, Manzini et col. ont montré que des sondes fluorescentes telles que Fura red, calcium green et calcéine sont bien transportés sous leur forme AM par MRP mais que seuls calcium green et calcéine sont transportés sous leur forme d'acide libre (Manzini and Schild, 2003).

Les sondes fluorescentes s'utilisent avec des techniques de fluorométrie, comme la spectrométrie, de cytométrie de flux, la microscopie par épifluorescence ou la microscopie confocale.

La spectrofluorométrie avec les sondes fluorescentes est très proche de la technique utilisée avec les substances radiomarquées. Elle consiste à incuber des populations de cellules directement en présence d'un marqueur fluorescent, de rincer le milieu et de mesurer à l'aide d'un spectrofluoromètre

l'intensité de fluorescence dans un volume donné contenant un nombre déterminé de cellules connu. Une autre approche consiste à mesurer l'intensité de fluorescence dans les compartiments de part et d'autre d'une membrane. Ceci permet de mesurer l'efflux de la sonde fluorescente à travers cette membrane. Avec cette technique, Fujita et col. ont montré l'excrétion de calcéine par MRP1 à travers la paroi intestinale de rat (Fujita et al., 1997).

La cytométrie en flux permet, contrairement à la spectrométrie, de mesurer l'intensité de fluorescence de cellules individuelles parmi une population entière. Pour cela les cellules suivent un flux de milieu de survie dans un capillaire qui les présentent une après l'autre devant un faisceau laser qui va exciter chaque cellule en fonction du spectre d'absorption du fluorophore utilisé. Un capteur recueille l'intensité de la fluorescence émise et commande un système de déviation du flux porteur qui isole les cellules marquées des cellules non marquées. Cette technique permet de trier les cellules suivant différents critères. Il est possible d'incuber les cellules préalablement avec du iodure de propidium qui marque le noyau des cellules mortes. Il a des spectres d'absorption et d'émission (305 nm/617) qui lui permettent d'être utilisé simultanément avec des sondes fluorescentes telles que calcéine ou fluorescéine. La cytométrie en flux va donc, dans ce cas, permettre d'écarter les cellules mortes de l'échantillon. Mathew et col. utilisent cette technique. Ils montrent par PCR et immunohistochimie que P-gp est exprimée dans les cellules épidermales de souris nouveau-nées (Sleeman et al., 2000). La cytométrie en flux, comme test fonctionnel, met en évidence l'activité de P-gp par l'incorporation de rhodamine 123 et sa modulation par le vérapamil.

La microscopie par épifluorescence permet d'enregistrer en temps réel la cinétique de chargement de sondes fluorescentes sur des populations cellulaires mais aussi sur des tissus entiers vivants. Grâce à un chromateur il est possible de couvrir un large spectre d'excitation, en particulier dans l'UV qui n'est pas accessible avec un laser. Cette technique est utilisée par Jakob et col. sur des tranches de langue de rat (Jakob et al., 1998; Manzini and Schild, 2003). Ils mesurent l'accumulation de calcéine-AM en temps réel sur du tissu vivant. En modulant la cinétique d'accumulation avec du vérapamil ou de la cyclosporine A ils mettent en évidence l'activité de MDR1 dans les bourgeons du goût des papilles gustatives de rat. Ils confirment la présence de la protéine par western blot et ainsi que sa localisation par immunohistochimie.

La microscopie confocale est aussi utilisée. Elle est proche de la microscopie par fluorescence. Elle utilise un laser pour exciter la préparation. Le laser parcourt point par point la préparation et un cache optique synchronisé permet d'obtenir des images dans l'épaisseur du tissu avec une faible profondeur de champ, éliminant ou atténuant fortement les émissions (diffraction et réfraction) des couches sus-jacentes et sous-jacentes. Les images obtenues représentent une section optique et sont

plus nettes et moins bruitées que des images obtenues en microscopie de fluorescence classique. Il est possible d'obtenir plusieurs sections optiques dans l'épaisseur du tissu observé. Par ordinateur, on reconstruit la préparation en volume. Cette technique est utilisée par Li et col. pour mettre en évidence l'extraction de Fluo3-AM par MRP1 sur des tranches de peau de souris (Li et al., 2005).

c) Test à la calcéine-AM

Le test à la calcéine-AM est une technique répandue de mise en évidence du phénotype de résistance pléiotropique. Des kits incluant la sonde fluorescente combinée à un bloqueur des transporteurs de multiples drogues sont commercialisés. Cette technique peut être employée pour détecter des cellules résistantes, pour déterminer les propriétés des transporteurs à l'origine de cette résistance ou pour tester des modulateurs de ces transporteurs. Elle repose sur les propriétés de la calcéine-AM qui est une molécule lipophile non fluorescente qui pénètre rapidement dans les cellules non résistantes. Le groupement AM est clivé par les estérases dans le milieu intracellulaire. La calcéine sans sa fonction ester est une molécule hydrophile fluorescente. La calcéine va donc s'accumuler dans les cellules non résistantes ou bien dans les cellules résistantes en présence d'un bloqueur des transporteurs de multiples drogues (Figure 17). L'intensité de fluorescence de calcéine n'est pas influencée par le pH ni par la concentration en ions Ca^{2+} du milieu intracellulaire (Lebedeva et al., 2011). L'intensité de la fluorescence est donc proportionnelle à la quantité de calcéine qui s'accumule. Cette propriété rend la calcéine particulièrement adaptée pour des tests quantitatifs (Liminga et al., 1994). La calcéine-AM est surtout rejetée par P-gp (Hollo et al., 1994; Homolya et al., 1996), tandis que calcéine est rejetée par Mrp1 (Feller et al., 1995b). Sur des cellules rendues résistantes par l'expression de P-gp on peut étudier l'accumulation de calcéine en présence d'un bloqueur spécifique. Sur des cellules dont la résistance est due à l'expression de Mrp1 il est possible d'étudier l'efflux de calcéine après accumulation en présence d'un bloqueur spécifique. La résistance pléiotropique peut impliquer les deux transporteurs simultanément, en combinant des bloqueurs spécifiques pour chacun, il possible d'étudier chaque composante et sa cinétique grâce à la calcéine-AM (Essodaigui et al., 1998) notamment au niveau de cellules uniques grâce à la microscopie par fluorescence couplée à un système d'imagerie (Raaijmakers et al., 2002).

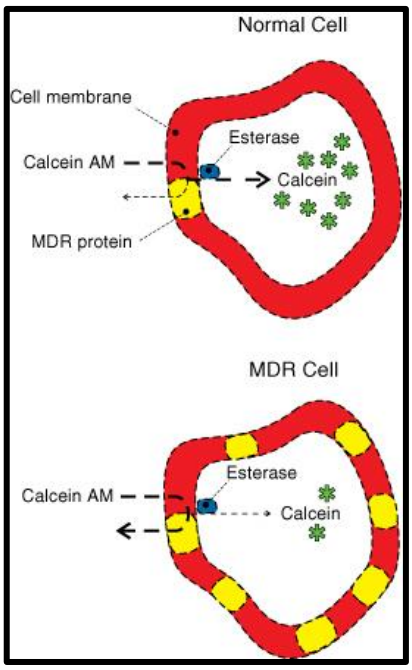


Figure 17: Principe du test à la calcéine-AM. Dans les cellules normales, calcéine acétoxyméthyl (calcéine-AM), non fluorescente, diffuse facilement à travers la membrane plasmique. La calcéine, fluorescente, s'accumule dans le cytoplasme après clivage du groupement AM par les estérases endogènes. Dans les cellules résistantes, la surexpression de P-gp augmente l'expulsion de calcéine-AM à partir de la membrane cellulaire avant l'hydrolyse enzymatique du groupement AM, réduisant ainsi l'accumulation de calcéine intracellulaire. D'après *Principle of the Vybrant® Multidrug Resistance Assay Kit (Invitrogen).*

2. Utilisation de la PCR et de ses dérivées pour localiser et quantifier l'expression de MDR1 et de MRP1

a) L'amplification par polymérisations en chaine

La PCR est une technique qui a révolutionné la biologie moléculaire. Elle a été conçue en 1983 par Kary Mullis puis mise au point en 1986 (Mullis et al., 1986). Pour ces travaux sur la PCR, Kary Mullis a obtenu le prix Nobel de chimie en 1993.

La PCR permet d'amplifier de façon considérable la quantité d'ADN à partir d'une très faible quantité de matériel génétique de départ. Le principe de la PCR repose sur le même phénomène de réplication de l'ADN qui a lieu dans le noyau des cellules avant division. La PCR nécessite donc un échantillon d'ADN à amplifier, une polymérase qui va assurer la réplication, des amorces et des nucléotides qui vont être utilisées pour synthétiser les nouveaux brins. Les amorces sont des fragments d'ADN synthétisés au préalable, elles sont conçues pour se fixer sur une région spécifique des deux brins d'ADN complémentaires à amplifier. Un cycle de PCR est constitué de trois étapes. La première

étape, consiste en une dénaturation des deux brins d'ADN par une élévation de température. La deuxième étape consiste à baisser la température afin que les amorces s'hybrident au niveau de leur cible. Dans la troisième étape, à la température adéquate, la polymérase va se fixer aux amorces et va commencer l'élongation d'un nouveau brin. A chaque nouveau cycle, le nombre de fragments d'ADN est doublé. L'amplification du matériel génétique se fait donc de façon exponentielle.

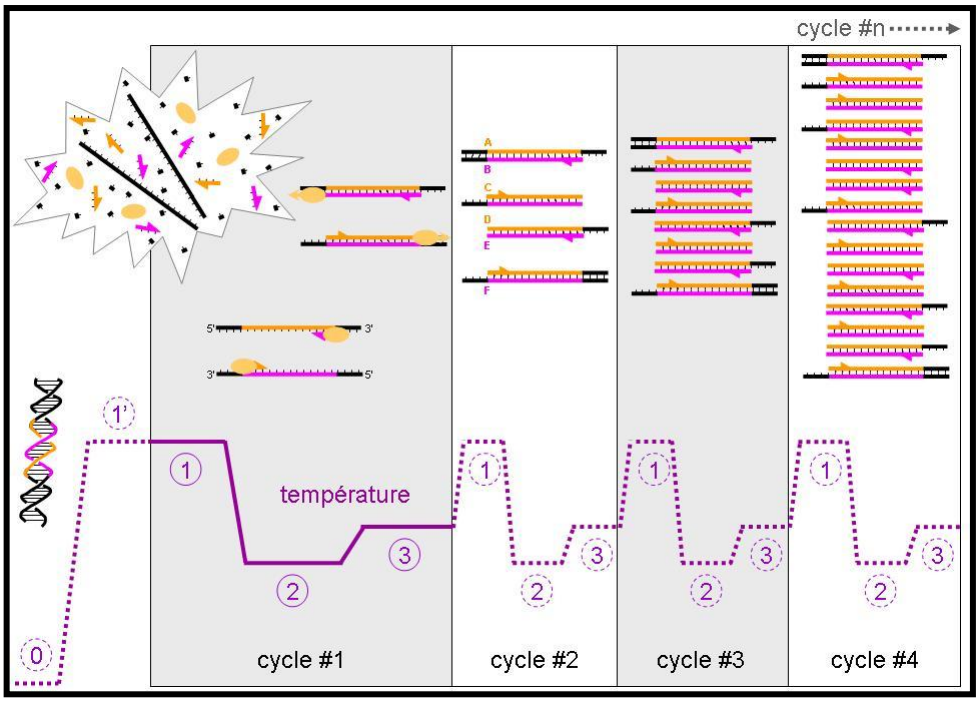


Figure 18: Principe de base de la PCR. 1) Phase de dénaturation. Généralement à 95°C, cette phase permet de dénaturer les doubles brins d'ADN. 2) Phase d'hybridation. Entre 50 et 60°C, cette phase permet aux amorces de s'hybrider aux brins d'ADN à amplifier. 3) Phase d'élongation. La Taq polymérase reconnaît les amorces et synthétise un nouveau brin d'ADN complémentaire à partir des nucléotides présentes dans le milieu de réaction. Généralement à 72°C. Cette température permet à la Taq polymérase de fonctionner dans des conditions optimales. L'amplification de l'ADN par PCR est exponentielle, à partir d'une seule copie et après 35cycles, on obtient 68 milliards de copies. Schéma d'après Ygonaar 2006.

Dans les premiers temps la réaction était catalysée par le fragment de Kleenow issu de l'ADN polymérase I d'*E.coli*. Les hautes températures nécessaires pour la dénaturation des brins d'ADN détruisaient cette protéine. Il fallait donc rajouter la polymérase au début de à chaque nouveau cycle. Une des grandes améliorations de la PCR a consisté à utiliser la Taq polymérase. Cette protéine provient d'une une bactérie thermopile *Thermus aquaticus* recueillie la première fois dans les sources d'eau chaude à 70°C du parc de Yellow Stone. La Taq polymérase est une protéine thermostable capable de fonctionner aux hautes températures mises en jeu dans les réactions de PCR. L'utilisation

de la Taq Polymérase a conduit à l'automatisation des réactions de PCR et à la propagation des thermocycleurs dans les laboratoires en quelques années. La PCR est devenue un outil rapide, fiable et bon marché. Elle est à la base de l'essor de la biologie moléculaire. Grâce à sa sensibilité et à sa spécificité, elle est utilisée dans de nombreux domaines tels que la médecine, le séquençage de génomes, la justice, l'archéologie et la paléontologie.

b) RT-PCR et RT-PCR quantitative

La RT-PCR, ou PCR après rétrotranscription, est une technique dérivée de la PCR qui permet d'amplifier du matériel génétique à partir d'échantillons sous la forme d'ARN. Cette technique nécessite une étape préalable qui consiste à convertir les brins d'ARN en simple brins d'ADN complémentaires (ADNc). Cette réaction est catalysée par une rétrotranscriptase, une enzyme que l'on retrouve chez les rétrovirus comme le HIV. Les brins d'ADNc vont pouvoir être amplifiés par une PCR traditionnelle.

Avec la RT-PCR il est possible de mettre en évidence l'expression d'un gène dans un tissu voire une cellule unique. Au préalable d'une RT-PCR, on extrait l'ensemble du transcriptome d'un tissu. Le transcriptome représente, par l'intermédiaire des ARNm, l'ensemble des gènes exprimés dans ce tissu. L'ensemble du transcriptome est rétrotranscrit en ADNc. Pour mettre en évidence l'expression d'un gène on va chercher à amplifier spécifiquement son ADNc correspondant. Pour cela il faut élaborer à partir des bases de données génomiques une paire d'amorces qui vont se fixer spécifiquement à cet ADNc. Si le gène est exprimé, les amorces vont pouvoir s'hybrider, ce qui va permettre l'amplification par PCR. Cette technique a été utilisée par Schiengold et col. pour mettre en évidence l'expression de mdr1, mdr2 et mdr3 dans divers tissus au cours de l'ontogénèse de souris BALB/c et C57BL/6 (Schiengold et al., 2001). En plus de l'aspect qualitatif, la RT-PCR peut être utilisée pour une quantification de l'expression d'un gène. La quantification peut se faire relativement à l'expression de gènes de ménage tels que le gène de la Rhodopsin, de la cyclophilin A ou de la β-actine. Ces gènes de ménage sont des gènes exprimés ubiquitairement de façon constante et sans régulation. Cette technique a été utilisée par Tsai et col. pour suivre le niveau d'expression de Mdr1a dans le cerveau au cours de l'ontogénèse de la souris (Tsai et al., 2002). Rosati et col. quant à eux ont utilisé cette technique pour suivre le niveau d'expression de Mdr1a, Mdr1b, Mrp1 et Mrp2 dans différents tissus au cours de l'ontogénèse du rat (Rosati et al., 2003).

c) RT-PCR à partir d'une cellule unique

La RT-PCR permet d'examiner l'expression de gènes au niveau du tissu. Dans des tissus complexes le résultat peut ne pas refléter les spécificités des différents types cellulaires voire même de

cellules prises individuellement. Des techniques ont été mises au point afin de porter la résolution de la RT-PCR au niveau de la cellule unique sachant qu'elle peut contenir au mieux 1pg d'ARNm (Dixon et al., 2000). Plusieurs méthodes de récupération intracellulaire sont employées. A partir de cellules dissociées le contenu cytoplasmique est directement recueilli à l'aide d'une pipette de verre. Les cellules dissociées peuvent être triées par FACS. Cela permet d'effectuer une sélection sur la base de critères morphologiques ou par des marquages fluorescents par exemple. Il est possible aussi de récupérer des cellules sur des tranches de tissu par microdissection au laser. Grâce à la pipette de verre, il est possible de coupler une technique de patch-clamp avec la RT-PCR sur cellule unique. Cette combinaison est particulièrement intéressante pour l'étude des neurones puisque le patch-clamp permet de caractériser fonctionnellement une cellule et de pouvoir ensuite en aspirer le contenu cytoplasmique par la pipette d'enregistrement pour en réaliser ensuite l'analyse moléculaire (Audinat et al., 1996; Phillips and Lipski, 2000). La manipulation d'une si faible quantité de matériel génétique peut nécessiter une préamplifcation de l'ARN à l'aide d'une RNA polymérase. Le matériel de rétrotranscription peut être directement contenu dans la pipette de patch, comme l'ont fait Eberwine et col. pour analyser l'expression de gènes sur un neurone de l'hippocampe (Eberwine et al., 1992).

F. Problématique

Les transporteurs de la résistance pléiotropique sont-ils fonctionnels dans l'épithélium olfactif de rongeurs?

La présence de P-gp et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif n'a, à notre connaissance, pas encore été montré chez le rat et la souris nouveau-né. Chez la souris adulte une seule étude met en évidence l'expression et l'activité de P-gp dans l'épithélium olfactif. Durant la période de ma thèse, en 2010, trois études ont mis en évidence l'expression de Mrp1 dans l'épithélium olfactif de rat adulte (Genter et al., 2010; Kudo et al., 2010), parmi celles-ci, une seule met en évidence l'expression de P-gp (Thiebaud et al., 2010). Ces études utilisent les techniques de RT-PCR, RT-PCR quantitative, ADN branché, immunohistochimie ou hybridation in situ. Les études par PCR sont fiables pour mettre en évidence l'expression de certains gènes, mais ne garantissent pas qu'une protéine va être traduite, adressée et fonctionnelle. Les méthodes d'immunohistochimie ne garantissent pas qu'une protéine est fonctionnelle.

La première partie de ce travail de thèse a donc consisté à mettre en évidence de façon fonctionnelle l'activité de P-gp et de MRP1 dans l'épithélium olfactif de rat et de souris nouveau-nés. Pour cela nous avons travaillé sur une préparation en tranche dans le plan coronal de la cavité nasale et observé le chargement par l'épithélium olfactif d'un méthyl ester de la calcéine (calcéine-AM), une sonde fluorescente inerte substrat de P-gp et de Mrp1, en présence de bloqueurs spécifiques de P-gp et de Mrp1. (principe du calcein assay)

Les transporteurs de la résistance pléiotropique ont-ils une influence sur la réponse aux odorants ?

P-gp et MRP1 sont surtout exprimés dans les organes d'échange et d'excrétion comme l'intestin, le rein, la rate, les poumons mais aussi au niveau des barrières pharmacologiques de l'organisme comme la barrière hémato encéphalique. Cette localisation ainsi que de nombreuses études tendent à montrer que P-gp et Mrp1 sont surtout impliqués dans les fonctions de protection et de détoxication de l'organisme. Quelques études fonctionnelles montrent que P-gp et Mrp1 sont exprimés dans de nombreux autres organes ou tissus de l'organisme comme la peau, le cœur et que P-gp et Mrp1se trouvent impliqués dans des fonctions autres que la détoxication, notamment dans le transport de lipides, l'apoptose, le métabolisme du cholestérol, la migration de cellules dendritiques ou bien dans l'inflammation. Bien que l'expression de P-gp et de MRP1aient été montrée chez le rat adulte, et que la muqueuse olfactive ait été reconnue comme barrière pharmacologique chez le bovin, aucune étude n'a porté sur l'implication de P-gp et de MRP1 dans la réponse olfactive.

La deuxième partie de ce travail de thèse a donc consisté à tester si les protéines P-gp et Mrp1 pouvaient interférer avec la fonction sensorielle, avec la réponse olfactive aux stimulations odorantes. Pour cela nous pouvions utiliser la technique d'enregistrement d'électro-olfactogramme. Cette technique consiste à recueillir, à l'aide d'une électrode posée à la surface de l'épithélium olfactif, la sommation des potentiels générateurs d'une population de neurones olfactifs en réponse à une stimulation odorante. Pour juger de l'implication de P-gp et/ou de MRP1 dans la réponse olfactive, nous avons enregistré des électro-olfactogrammes sur la muqueuse olfactive de rats et de souris adultes en présence des bloqueurs spécifiques utilisés précédemment. L'électro-olfactogramme témoigne de l'état fonctionnel de l'ensemble de la muqueuse olfactive, car les conditions de son enregistrement respectent son état physiologique.

Finalement, la troisième partie de ce travail, complète cette étude puisqu'elle a consisté à mettre en évidence l'expression de P-gp et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif entier à l'aide d'une technique de RT-PCR afin d'appuyer les résultats obtenus précédemment. Nous avons aussi essayé de localiser au niveau cellulaire l'expression de ces deux transporteurs à l'aide d'une technique de RT-PCR sur cellule unique afin de pouvoir éclaircir les possibles mécanismes d'action de P-gp et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif.

Pour effectuer cette étude nous avons choisi de travailler sur le rat et la souris car ce sont deux modèles largement employés dans la recherche sur les transporteurs de la résistance pléiotropique et sur l'olfaction. Nous avons utilisé parallèlement ces deux modèles dans le but de mener une étude comparative.

Pour des raisons techniques nous avons effectué le test à la calcéine sur des nouveau-nés âgés entre 0 et 2 jours. La préparation en tranches dans le plan coronal ne nous a pas permis de travailler sur des animaux plus âgés à cause d'un rapide durcissement du cartilage de la cavité nasale et des os du crâne. Pour des raisons techniques également, la technique d'EOG a été pratiquée uniquement sur des animaux adultes puisqu'elle s'est avérée trop délicate sur des nouveau-nés. Le choix de deux stades de développement s'avère toutefois intéressante afin de recueillir des informations d'un point de vue ontologique.

Matériels

et

méthodes

II. Matériels et méthodes

A. Odorants, substances pharmacologiques et solutions.

1. Odorants

Etant donnée la sélectivité des neurones olfactifs, afin d'activer la plus large gamme de ces cellules réceptrices présentes dans la muqueuse, neuf molécules odorantes ont été choisies en fonction de leur structure, de leur famille chimique et de leur coefficient de dissociation (eau/octanol). Elles sont listées dans le **Tableau 2**.

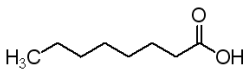
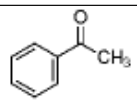
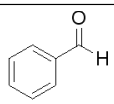
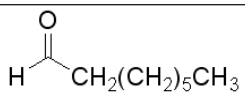
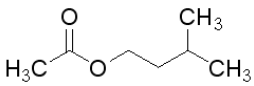
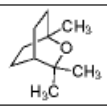
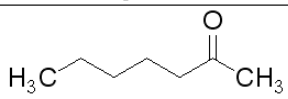
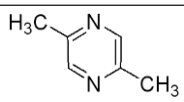
Nom	Structure chimique	Fournisseur et numéro de CAS	Coefficient de dissociation (Log p)
Acide Octanoïque		Sigma Aldrich 124-07-2	2.67
Acétophénone		Sigma Aldrich 98-86-2	1.59
Benzaldéhyde		Sigma Aldrich 100-52-7	1.48
Octanol	$CH_3(CH_2)_6CH_2OH$	Sigma Aldrich 111-87-5	2.95
Octanal		Sigma Aldrich 124-13-0	2.78
Acétate d'isoamyl		Sigma Aldrich 123-92-2	2.3
1,8 Cinéole		Sigma Aldrich 470-82-6	1.86
2-Heptanone		Sigma Aldrich 110-43-0	2.18
2,5 diméthyl pyrazine		Sigma Aldrich 123-32-0	0.77

Tableau 2: Molécules odorantes utilisées pour les enregistrements d'EOG

L'acide octanoïque est un acide gras saturé à chaine linéaire. L'acétophénone est une cétone aromatique. Le benzaldéhyde est un aldéhyde aromatique. L'octanol est un alcool linéaire. L'octanal est un aldéhyde linéaire. L'acétate d'isoamyl est un ester linéaire. Le 1,8 cinéole est un ether-oxyde cyclique. La 2-heptanone est une kétone linéaire. La 2,5-dimethyl pyrazine est un composé organique hétérocyclique, elle a été choisie pour sa faible solubilité dans l'eau (log P=0,77) comparée à celle de l'acétate d'isoamyl (log P=2,30).

Ces odorants ont été dilués avec du diméthylsulfoxyde (DMSO, Sigma Aldrich, 67-68-5), un solvant organique, sous forme de solution de stockage de 1M à 6°C et à l'abri de la lumière. Les solutions de travail ont été obtenues par dilution avec une solution de type Ringer.

Ces molécules odorantes ont été utilisées sous forme pure ainsi que sous la forme d'un mélange de huit odorants les incluant toutes à l'exception de la 2,5-diméthyl pyrazine.

2. Substances chimiques et pharmacologiques

Les différentes substances pharmacologiques sont listées dans le **Tableau 3**.

Nom	Structure chimique	Fournisseur et numéro de CAS
3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)		Calbiochem 28822-58-4
Probénécide		Sigma Aldrich 57-66-9
MK571		Enzo 115104-28-4
Vérapamil		Biomol 23313-68-0
Cyclosporine A		Sigma Aldrich 59865-13-3
PGP-4008		Santa Cruz 148504-34-1

Tableau 3: Substances pharmacologiques utilisées au cours des enregistrements EOG et des tests à la calcéine

a) 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)

L'IBMX est un inhibiteur non spécifique des phosphodiestérases de l'AMPc et de la GMPc . L'inhibition du catabolisme de l'AMPc dans les neurones olfactifs provoque une accumulation de celle-ci dans le milieu intracellulaire comparable à celle rencontrée dans la transduction du signal. L'application d'IBMX va provoquer une dépolarisation du neurone via les canaux cationiques couplés aux nucléotides cycliques (CNG) et aux canaux chlore calcium dépendants. Cette dépolarisation est qualifiée de pseudo-olfactive puisqu'elle est indépendante de l'activation des récepteurs olfactifs couplés à une protéine G.

L'IBMX est mis en solution avec du DMSO et du Ringer standard afin d'obtenir une solution mère d'une concentration de 10^{-2}M contenant 10 % de DMSO qui est conservée à -20°C.

b) Préparation des solutions mère des bloqueurs de MDR1

Le vérapamil est mis en solution de 2mM avec du Ringer standard et conservé en aliquots à -20°C.

La cyclosporine A mise en solution de 25mM avec du DMSO et stockée en aliquots à -20°C.

c) Préparation des solutions mères des bloqueurs de MRP1

Le probénécide est préparé extemporanément. Il est dissout dans du NaOH 1N puis dilué à 5mM dans du Ringer. Le pH est réajusté à 7.2 avec du HCl 10N.

Le MK571 est mis en solution de 10mM avec du Ringer et conservé en aliquots à -20°C pendant deux mois au maximum.

Les différentes sondes fluorescentes utilisées sont listées dans le **Tableau 4**, leurs spectres d'absorption et d'émission sont présentés dans la Figure 19.

Nom	Structure chimique	Fournisseur et numéro de CAS
Calcéine acétoxymethyle ester (Calcein-AM)		Invitrogen 148504-34-1
Fura2 acétoxymethyle ester (Fura2-AM)		Invitrogen 108964-32-5
Fluo3 acétoxymethyle ester (Fluo3-AM)		Invitrogen 121714-22-5
Fluo4 acétoxymethyle ester (Fluo4-AM)		Invitrogen
Calcium Green		Invitrogen 186501-28-0
Fluorescein β-D-galactopyranoside (FDG)		Interchim 17817-20-8

Tableau 4: Sondes fluorescentes utilisées.

d) calcéine Acétoxyméthyl Ester (calcéine-AM)

La calcéine-AM est un substrat des transporteurs de la résistance pléiotropique tels que MDR1 et MRP1. Elle est souvent utilisée dans les tests de viabilité cellulaire. Le groupement ester (AM) rend la molécule de calcéine liposoluble, ce qui lui permet de traverser la membrane cellulaire, d'entrer dans la cellule. Dans le milieu intracellulaire le clivage du groupement ester AM par des estérases non spécifiques va, d'une part, empêcher la calcéine de retraverser la membrane cellulaire et va, d'autre part, lui conférer sa capacité fluorescente.

La calcéine-AM est mélangée à du DMSO afin d'obtenir une solution mère de 1mM, conservée à -20°C.

e) *Fura2 Acétoxyméthyl*

Le fura2-AM est un ester passant la membrane cellulaire dont le clivage intracellulaire réduit les possibilités de fuite du fura2 en dehors de la cellule. Le fura2 lié à un ion Ca++ a un spectre d'absorption lumineux différent de celui qu'a la forme libre. Cette double excitation permet d'établir un rapport des absorptions, une mesure ratiométrique de la fluorescence, donc une détermination de la variation de la concentration du calcium intracellulaire..

Le fura2-AM est mélangé avec du DMSO pour être stocké -20°C en aliquots de 10mM.

f) *Fluo 3 acétoxyméthyl et fluo 4 acétoxyméthyl*

Ce sont des marqueurs fluorescents utilisés pour rendre compte de la concentration intracellulaire en ions Ca^{2+}. Le fluo3-AM est aussi un ester qui peut s'accumuler dans le milieu intracellulaire. Cette molécule possède une forte affinité pour les ions Ca2+. Le complexe Fluo3-Ca^{2+}est fluorescent.

Le fluo4-AM est un dérivé du fluo3-AM présentant une fluorescence plus intense et plus stable.

Le fluo3-AM et le fluo4-AM sont mélangés avec du DMSO et sont stockés à -20°C en aliquots à 10mM.

g) *Calcium Green 1 Acétoxyméthyl*

Calcium green 1 AM est aussi une molécule liposoluble. Elle est piégée dans le milieu intracellulaire lorsque son groupement ester est clivé par des estérases non spécifiques. Le complexe Calcium green-Ca2+ est fluorescent.

La calcium green est mis en solution de 10mM avec du DMSO et stockée à -20°C sous forme d'aliquots.

h) *Fluoresceine β-D-galactopyranoside (FDG)*

La FDG est un substrat de la galactosidase. A l'intérieur de la cellule, elle est d'abord hydrolysée en fluorescéine monogalactoside puis en fluorescéine hautement fluorescente.

La FDG est mise en solution de 10mM avec du DMSO et stockée à -20°C sous forme d'aliquots.

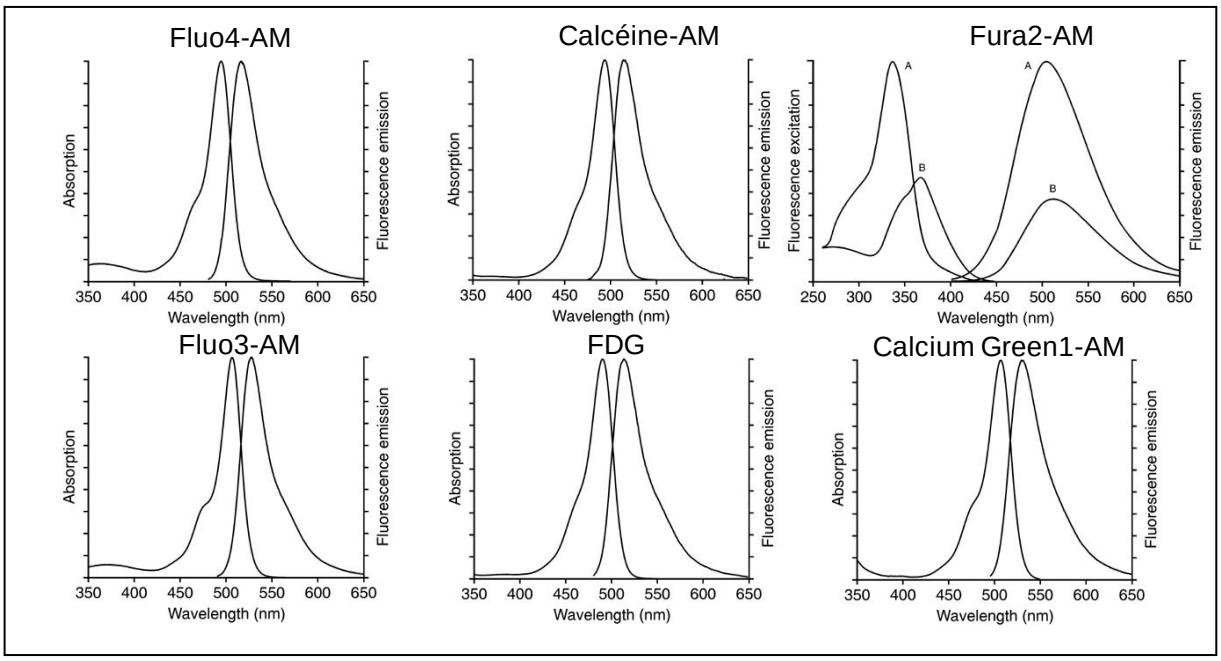


Figure 19: Spectres d'absorption et d'émission des diverses sondes fluorescentes utilisées. Ces spectres permettent de déterminer le choix d'un filtre dichroïque pour séparer les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. FDG= fluoresceine β-D-galactopyranoside.

3. Solutions

Tous les produits pour les solutions sont fournis par Sigma et conditionnés sous forme de poudre.

a) Ringer standard et solution à forte concentration en potassium

La solution de Ringer est une solution physiologique élaborée pour maintenir en vie les tissus de mammifères. Sa composition est détaillée dans le **Tableau 5**.

	Ringer (en mM)	Solution KCl (en mM)
NaCl	140	5
KCl	5	140
$CaCl_2$	2	2
$MgCl_2$	2	2
HEPES	10	10
pH ajusté à 7,2 avec NaOH Osmolarité ajustée à 315mOsm avec Glucose		

Tableau 5: Composition de la solution physiologique de type Ringer et de la solution de KCl 140mM

b) Ringer à Oxygéner

Cette solution de Ringer particulière nécessite d'être mise à « Buller » au moins 20 minutes avant son utilisation. Elle doit ensuite être oxygénée en permanence. Sa composition est détaillée dans le **Tableau 6**.

	Ringer Oxygéné (en mM)
NaCl	124
KCl	3
MgSO4	1.3
$CaCl_2$	2
NaH_2PO_4	1.25
$NaHCO_3$	26
Glucose	15
pH ajusté par oxygénation	

Tableau 6: Composition de la solution physiologique de type Ringer à oxygéner

c) Ringer d'après la composition du mucus olfactif

Solution physiologique dont la composition est basée sur celle du mucus présent à la surface de l'épithélium olfactif de rat (Reuter et al., 1998). Sa composition est détaillée dans le **Tableau 7**.

	Solution de type mucus (en mM)
KCl	45
$KC_2H_3SO_4$	20
$NaCH_3SO_4$	55
MgSO4	1
CaCl2	5
Hepes	10
Glucose	11
Mannitol	50
pH	7.4
Osmolarité	350mosm

Tableau 7: Composition de la solution basée sur la composition du mucus d'après Frings

d) Ringer modifié contenant du glycérol

Solution physiologique dans laquelle le sodium est remplacé par du glycérol. Ceci a pour but de prévenir les possibles effets neurotoxiques de l'entrée passive de sodium et par conséquent le gonflement et la lyse des cellules (Ye et al., 2006). Sa composition est détaillée dans le **Tableau 8**.

	Solution avec Glycérol (en mM)
Glycerol	250
KCl	2.5
Na H_2PO_4	1.2
$MgCl_2$	1.2
CaCl2	2.4
$NaHCO_3$	26
Glucose	11
pH	7.4
Osmolarité	315mosm

Tableau 8: Composition de la solution physiologique contenant du glycérol d'après Ye

B. Modèles animaux

Trois modèles animaux ont été utilisés pour réaliser l'ensemble des expériences. Des rats de souche Wistar ainsi que des souris de lignée sauvage de souche Balb/c et des souris transgéniques Mrp1$^{-/-}$ de souche FVB/NTac.

Les animaux de souche sauvage ont été fournis par Janvier (Le Genest St Isle) ce qui nous a permis de disposer d'un élevage sur place, dans l'animalerie du laboratoire.

Au contraire, la souche de souris transgénique a été fournie par Taconic (Germantown, USA) pour hébergement uniquement.

Chaque souche est élevée dans une pièce dédiée de l'animalerie. Les locaux sont maintenus à une température constante de 21-23 ° et de 55 % d'hydrométrie en fonction de la pièce. Un cycle jour/nuit de 12h est observé (8h/20h). Les animaux sont placés dans des cages adaptées à leur corpulence et sont nourris à volonté.

Les protocoles d'expérimentation animale ont été validés par le comité d'éthique de l'Université de Bourgogne.

1. Souris transgéniques FVB/Ntac mrp1 $^{-/-}$

D'après Taconic, Mrp1 targeted Mutation Mice:

Le gène Abcc1 a été rendu invalide par recombinaisons homologues dans le laboratoire de Jan Wijnholds, Piet Borst, et collaborateurs au Netherlands Cancer Institute (Wijnholds et al., 1997).

C. Imagerie par fluorescence : test fonctionnel à la calcéine-AM

1. Préparation en tranches

Afin de pouvoir obtenir des tranches dans le plan coronal de la cavité nasale nous avons du utiliser des souris et des rats nouveau-nés âgés entre 0 et 2 jours (P0-P2). Ces animaux sont anesthésiés par hypothermie, pendant 5 à 10minutes à -20°C. Ils sont ensuite décapités, la mâchoire inférieure et la peau sont retirées. La tête est collée verticalement contre un block d'agar. La préparation est placée dans une cuve remplie de Ringer à 6°C. La découpe s'effectue avec un microtome à lame vibrante Leica VT 1000M muni de lames Gillette Bleue Extra. La coupe s'effectue à 0.05 mm/s avec une fréquence de vibration de 120 Hz. Les tranches effectuées sur la souris font 100 µm d'épaisseur et celles sur le rat font 150 µm à cause d'une plus grande rigidité du tissu.

Les tranches sont transférées à l'aide d'un pinceau dans une boîte de Pétri contenant du Ringer. Elles sont examinées sous une loupe binoculaire afin d'effectuer une sélection. Les tranches traversant le bulbe olfactif nous assurent une découpe suffisamment caudale pour que le tissu présent sur le

septum soit l'épithélium olfactif et non pas l'épithélium respiratoire. Les tranches sont ensuite sélectionnées sur des critères d'état général de la préparation.

2. Enregistrements

Les tranches sont placées individuellement dans une chambre d'enregistrement et plaquées au fond avec une lyre en acier inoxydable tissée de fils en lycra. Pour chaque animal une tranche est consacrée au témoin, elle est incubée dans du Ringer en présence de calcéine 1 µM uniquement. En fonction du nombre de tranches obtenues correspondant aux critères de sélection, 2 à 3 autres conditions sont testées simultanément en comparaison avec le témoin. Ces conditions consistent en l'incubation d'une tranche avec calcéine 1 µM dans du Ringer en présence d'un bloqueur de MDR1 ou de MRP1. Les bloqueurs testés sont vérapamil 100 et 200 µM, cyclosporine A 5 et 10 µM, probénécide 2.5 et 5mM ainsi que MK571 25 et 50 µM et quelques essais avec PGP 4008.

Les tranches sont observées premièrement par transmission via un microscope Olympus BX51 BWI muni d'un objectif à immersion Olympus UMPlan X10 et d'un filtre dichroïque. Un schéma simplifié de l'installation est présenté **Figure 20**. Les tranches sont ensuite illuminées à une longueur d'onde de 480 nm à l'aide d'un Polychrome V (TillPhotonics) (Messler et al., 1996). Une première image, à T0, est prise après 8 minutes de pré-incubation car d'une part la fluorescence est trop faible avant et d'autre part cela permet de lancer l'incubation des autres tranches avec 2 minutes d'intervalle. Pour chaque tranche une image est prise à T0, T0+15minutes, T0+30minutes T0+45minutes et T0+60minutes. L'acquisition s'effectue avec une caméra CCD refroidie (Sensicam PCO imaging) reliée à un ordinateur et contrôlée par un ICU (Till photonics) et par le logiciel Till Vision en version 4.5.53. Afin de conserver le même focus lors de l'alternance des différentes tranches sous l'objectif la mise au point s'effectue sur le cartilage qui reste parfaitement stable au cours des 60 minutes d'enregistrement. Cette méthode d'alternance permet d'effectuer des enregistrements sur du tissu dans le même état de conservation mais a l'inconvénient de présenter une position légèrement variable de la tranche entre les cinq images acquises. Afin d'obtenir cinq images d'une tranche avec un focus et une position identique, une deuxième méthode a consisté à n'enregistrer qu'une tranche à la fois. La tranche n'est positionnée sous l'objectif qu'une seule fois. Une image en transmission est prise en plus de chaque image en fluorescence. Comme il y a deux conditions à comparer, calcéine versus calcéine avec un bloqueur, pendant l'heure d'enregistrement de la première tranche, une deuxième tranche est mise de côté dans un Ringer oxygéné à 4°C et à l'abri de la lumière.

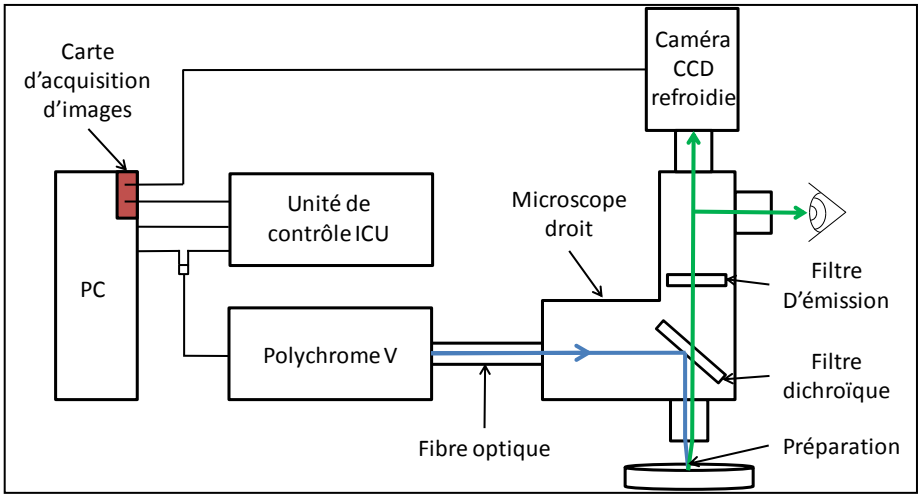


Figure 20: Schémas simplifié du poste d'imagerie

3. *Effectifs*

Si on exclue la mise au point du protocole et les préparations hors critères, nous avons conservé 52 enregistrements sur le rat, 44 enregistrements sur la souris et 31 enregistrements sur la souris transgénique, ce qui représente en tout, le traitement et l'analyse de 127 tranches coronales de la cavité nasale de rongeurs.

Effectif imagerie	Rats	Souris	Souris Mrp1 $^{-/-}$	Total
Témoin	19	16	11	**46**
vérapamil 100 µM	3	3		**6**
vérapamil 200 µM	3	3	5	**11**
cyclosporine A 5 µM	3	3	5	**11**
cyclosporine A 10 µM	4	6		**10**
probénécide 2.5mM	6	3	4	**13**
probénécide 5 µM	6	3		**9**
MK 571 25 µM	4	3	6	**13**
MK 571 50 µM	4	4		**8**
Total	**52**	**44**	**31**	**127**

Tableau 9: Effectifs de rats et de souris nouveau-nés pour les tests à la calcéine dont le résultat a été exploité

4. *Traitements et analyses des données*

Les images recueillies ont une résolution de 1376*1040 pixels. Avec un objectif x10 on observe une surface de 900*670 µm, dans ce cas, un pixel équivaut à 0,62 µm². L'intensité de la fluorescence

est numérisée avec une profondeur de 12 bits, soit une échelle de valeurs de l'intensité s'étendant de 0, absence de fluorescence, à 4095 le maximum.

a) Test fonctionnel à la calcéine :

Les images de tranches coronales de la cavité nasale sont traitées avec le logiciel d'acquisition TillVision (version 4.5.53). Une région d'intérêt (ROI) encadrant toute l'épaisseur de la muqueuse olfactive et s'étendant sur quelques dizaines de micromètres est dessinée. Cette région d'intérêt comprend en moyenne 13000 pixels. Elle est positionnée à l'endroit le plus net possible. Afin de relever la valeur du bruit de fond une deuxième zone excluant le tissu, zone témoin, est déterminée. Ces deux régions d'intérêt sont spécifiques à chaque tranche et sont enregistrées lors d'acquisitions à t0, t15, t30, t45 et t60. De ces régions d'intérêt on extrait la valeur minimum, la valeur maximum et la moyenne de l'intensité de la fluorescence. Les pixels présents dans cette région d'intérêt sont triés en fonction de leur intensité et représentés par un histogramme.

Les valeurs de l'intensité de la fluorescence ainsi recueillies sont analysées avec le logiciel Microsoft Excel 2007. La valeur moyenne du bruit de fond est soustraite à la valeur moyenne de l'intensité de la fluorescence dans la muqueuse olfactive. La valeur moyenne de l'intensité de fluorescence corrigée est intégrée dans un graphique qui en expose l'évolution en fonction du temps sous la forme d'une courbe. Une régression linéaire est calculée ($R^2 \geq 90$). De la droite obtenue est extraite la valeur de la pente. La pente est exprimée en intensité de la fluorescence par minute et représente la cinétique d'incorporation de la calcéine-AM dans l'ensemble de la muqueuse olfactive.

De deux à quatre tranches sont obtenues par animal. Pour chaque animal, une tranche témoin est incubée uniquement en présence de calcéine-AM. Les autres tranches recueillies sont incubées dans les différentes conditions expérimentales. Ainsi, afin de pouvoir comparer entre eux les différents échantillons provenant d'animaux différents, les enregistrements obtenus en présence de bloqueurs sont normalisés par rapport à leur condition témoin respective. La significativité ($p<0.05$) des effets observés en présence des bloqueurs par rapport à la condition témoin est calculée à l'aide d'un test t de student bilatéral par séries appariées.

D. Enregistrements électrophysiologiques : Electro-olfactogrammes (EOG)

1. Aspect technique

a) Préparation de la muqueuse olfactive principale

Le rat ou la souris adulte (3 à 6 mois) est profondément anesthésié par inhalation de CO_2 dans un appareil prévu à cet effet (Minerve). Il est ensuite décapité. La mâchoire inférieure est retirée. De façon unilatérale, la cavité nasale est découpée dans le plan sagittal par deux incisions dans le sens rostro-caudal. La première du coté ventral est effectuée le long du palais et la seconde du côté dorsal le long de l'os septal. On obtient deux parties de la tête de l'animal, une révélant le septum, l'autre révélant les cornets. Chez le rat l'une ou l'autre partie va être utilisée tandis que chez la souris, seule celle contenant le septum sera utilisée. Le fragment de tête va être placé dans une boite de Pétri de façon à ce que le plan de la muqueuse forme un angle entre 50° et 70° par rapport à l'horizontale. La préparation est ensuite immobilisée avec de la pâte à modeler afin d'être placée dans le poste d'enregistrement de l'EOG.

b) Descriptif du poste d'enregistrement

Dans sa boîte de Pétri, la préparation est placée sous une loupe binoculaire accompagnée d'une source de lumière polarisée.

L'électrode d'enregistrement est constituée d'une pipette en plastique remplie d'une solution saline gélifiée conductrice (Signa Gel, Parker Laboratory) dans laquelle est inséré un fil d'argent préalablement chloruré à l'aide d'une solution de chlorure ferrique. L'électrode a une longueur de 70mm et un diamètre interne à son extrémité de 300 µm offrant une résistance mesurée à environ 35KΩ.

Une électrode en argent chloruré en forme de disque sert de référence. Le contact avec le fragment de tête est assuré par une couche de solution saline gélifiée.

L'électrode d'enregistrement et l'électrode de référence sont reliées à un amplificateur différentiel fonctionnant en continu (DC) avec un filtre coupe haut à 300 Hz et un filtre anticrénelage. L'ensemble des enregistrements ont été acquis avec un gain de X1000. Le signal amplifié est dédoublé pour être envoyé vers un oscilloscope de contrôle et vers le module d'acquisition. L'acquisition se fait à l'aide d'un convertisseur analogique/numérique au format PCM/CIA (National Instrument) placé dans un

ordinateur portable et piloté par un logiciel développé spécifiquement pour les enregistrements extracellulaires (CNRS UMR 5020, Lyon, France). Les signaux sont numérisés avec une fréquence d'échantillonnage de 100 Hz. Un schéma simplifié du poste d'enregistrement est présenté dans la **Figure 21**.

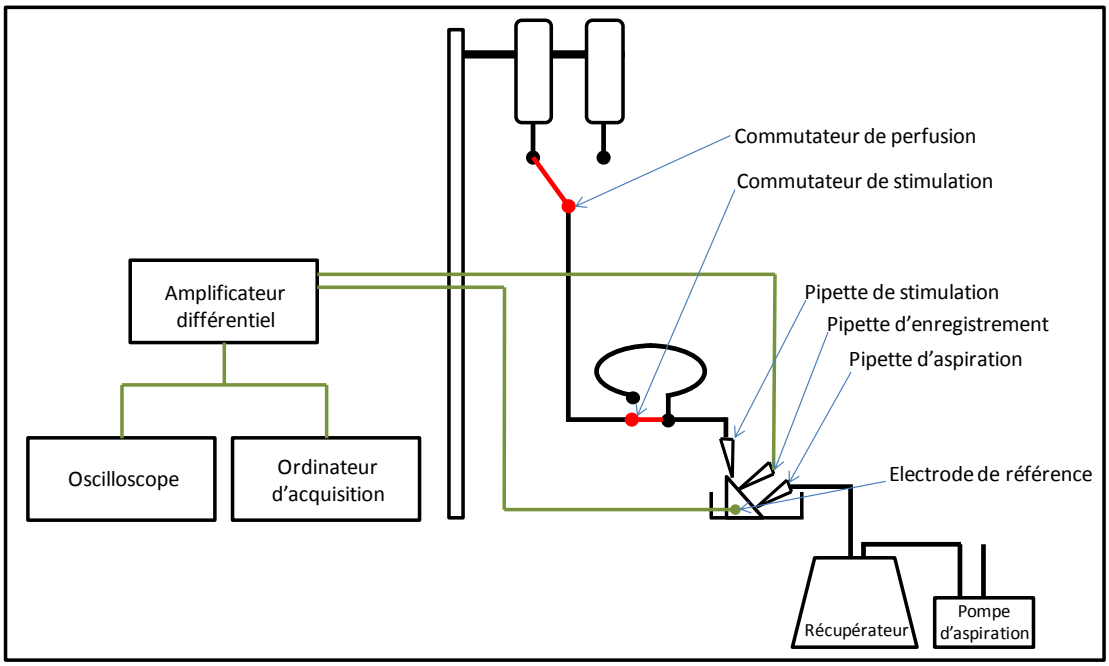


Figure 21: Schéma du poste d'enregistrement des EOG. En vert, câblage électrique. En noir épais, tuyaux d'écoulement et d'aspiration. En rouge, valves à deux positions.

L'ensemble du poste d'enregistrement, à l'exception de l'oscilloscope de contrôle et de l'ordinateur d'acquisition, est placé à l'intérieur d'une cage de Faraday et supporté par une table anti-vibrations sur coussin d'air.

L'approche de l'électrode à la surface de l'épithélium à l'aide d'un micromanipulateur se fait sous contrôle visuel via la loupe binoculaire. L'affichage du signal en temps réel sur l'oscilloscope de contrôle rend compte du moment où s'effectue le contact.

c) Système de stimulation olfactive

L'ensemble de la muqueuse olfactive est parcourue en permanence par un flux de solution de type Ringer standard. Cela maintient le tissue dans un état physiologiquement viable et permet d'appliquer des odorants et autres substances pharmacologiques en solution.

Les solutions de Ringer et de Ringer avec bloqueur sont stockées séparément chacune dans un réservoir de 150 mL qui par gravitation délivre un débit de 9 mL/min au niveau de la préparation située 94 cm plus bas. La solution s'écoule via une pipette placée au plus proche de la muqueuse, moins de 5mm en amont de l'électrode d'enregistrement. La hauteur du réservoir est importante puisqu'elle a une influence sur le débit. Il faut un débit suffisant pour que la stimulation tende à être maximale immédiatement. Le débit conditionne donc le profil de la stimulation et influence logiquement la forme du potentiel générateur enregistré (**Figure 22**).

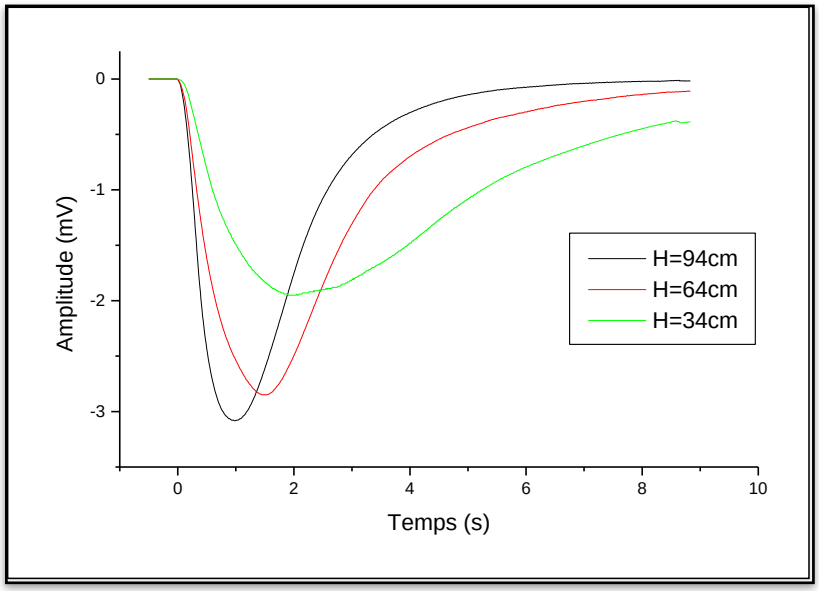


Figure 22: Influence du débit de la stimulation sur la qualité de l'EOG

C'est une lame aqueuse qui parcourt la surface de la préparation du fait de l'inclinaison de la préparation et de la pipette d'aspiration reliée à une pompe qui évacue immédiatement la solution.

Les solutions d'odorants et les solutions de substances pharmacologiques sont chargées et placées en attente de commutation vers la préparation dans une boucle de 120 µL (Rheodyne). Cette boucle est reliée à l'extrémité du système d'écoulement grâce à un robinet. Fermé, le flux est inchangé. Ouvert, le flux emprunte la boucle et pousse son contenu sur la préparation. Le contenu de la boucle met moins en moyenne 0.8s ±0.05 (n=10) pour passer sur la muqueuse et être évacué.

d) Sites d'enregistrement

La muqueuse olfactive a été explorée avec l'électrode d'enregistrement au cours d'expériences préliminaires afin de trouver l'emplacement qui offrait les meilleures réponses à l'acétate d'isoamyle et à la 2,5-diméthyle pyrazine. La **Figure 23** présente un exemple d'exploration de la muqueuse

olfactive. Un premier site a été choisi dans la partie caudo-médiane du septum et un deuxième site dans la partie dorsale du cornet 3.

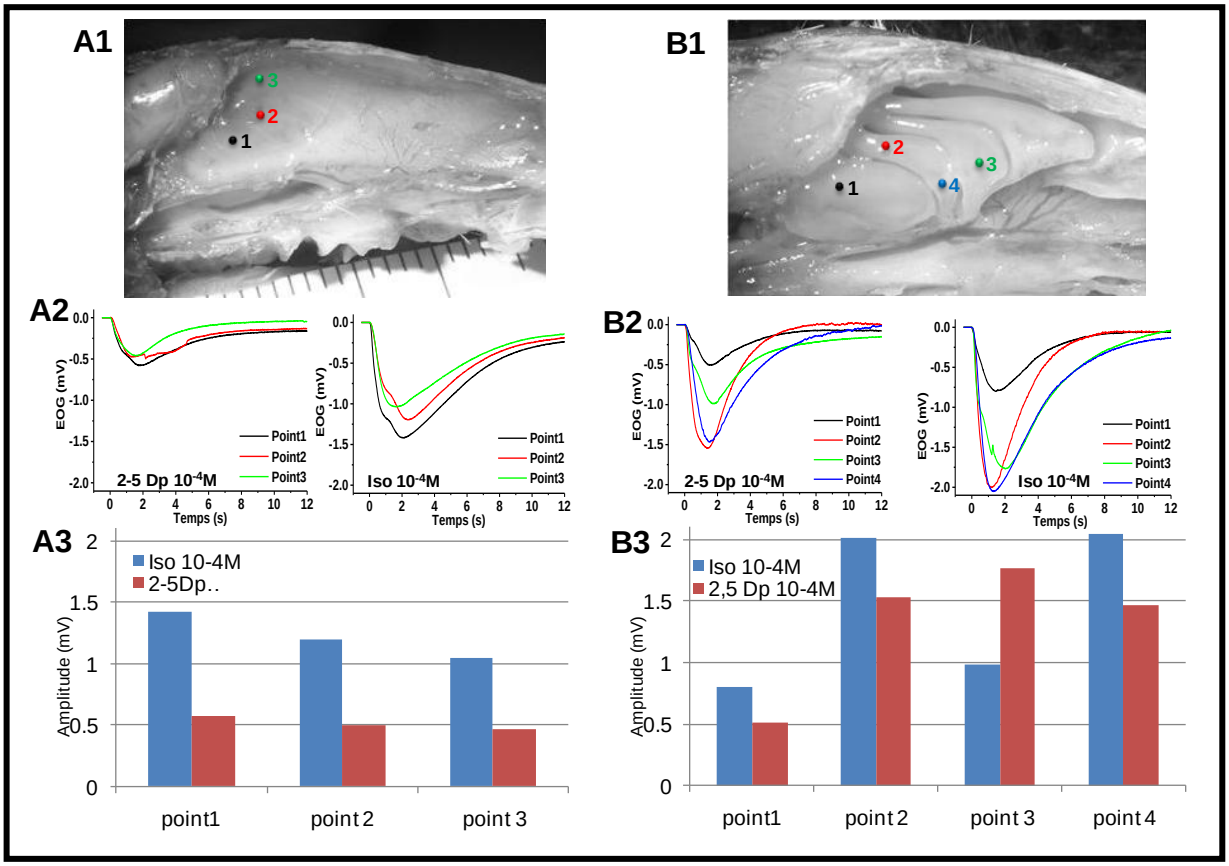


Figure 23: Exemples d'explorations du septum et des cornets chez le rat afin de localiser un site d'enregistrement qui réponde le mieux à la fois à l'acétate d'isoamyle et à la 2,5 diméthyle pyrazine. [A1,B1] : Photos respectives du septum et des cornets intacts. Les points représentent les sites d'enregistrement [A2,B2] : Traces d'EOG obtenues lors de l'application de 2.5 diméthyle pyrazine et d'acétate d'isoamyle à 10^{-4}M ; [A3,B3] : amplitudes des EOG mesurées sur ces traces.

2. *Protocole d'enregistrement*

a) *Effectifs*

Nous avons utilisé des rats Wistars et des souris Balb/c mâles et femelles, âgés de 3 à 10 mois. Si on exclue les animaux utilisés pour la mise au point du protocole et les préparations hors critères, nous avons effectué 17 enregistrements sur le cornet de rat, 18 enregistrements sur le septum de rat et 22 enregistrements sur le septum de souris. Cela représente le traitement et l'analyse de 1539 EOG.

Effectif EOG avec Bloqueur	Rats		Souris	
	Cornet	Septum	Septum	Total
vérapamil 200 µM	4	4	4	**12**
vérapamil 400 µM		1		**1**
cyclosporine A 5 µM	4	4	4	**12**
cyclosporine A 10 µM		1	1	**2**
cyclosporine A 15 µM	1		1	**2**
probénécide 2.5mM	4	4	4	**12**
probénécide 5 µM			4	**4**
MK 571 25 µM	4	4	4	**12**
Total	**17**	**18**	**22**	**57**

Tableau 10: Effectifs des rats et des souris utilisés pour les enregistrements d'EOG dont les résultats ont été exploités

b) Déroulement des enregistrements

Lorsque la préparation est installée dans le poste d'enregistrement mais avant que la solution de type Ringer n'arrose la muqueuse, un test de viabilité et de réactivité du tissu olfactif est effectué par un bref jet d'air saturé en acétate d'isoamyle délivré avec une seringue dirigée vers la muqueuse olfactive. Si on obtient une réponse d'amplitude satisfaisante, l'écoulement du liquide physiologique est enclenché et un deuxième contrôle est effectué par injection du mélange d'odorants à 10^{-4}M dans la perfusion via la boucle Rhéodyne. Si la réponse obtenue est supérieure ou égale à 1mV les enregistrements peuvent commencer. Chaque préparation est testée dans trois conditions différentes. Une première condition témoin, une seconde condition en présence d'un bloqueur et une troisième condition, après rinçage, dite de récupération.

Dans la condition contrôle la préparation reçoit un flux continu de solution physiologique de type Ringer standard. Cette solution physiologique est aussi utilisée pour diluer les odorants et l'IBMX à partir de leur solution mère respective. Les stimulations se font dans l'ordre suivant, solution de KCl 140mM, IBMX 10^{-5}M puis 10^{-4}M, mélange de 8 odorants à 10^{-5}M puis 10^{-4}M, acétate d'isoamyle 10^{-5}M puis 10^{-4}M, 2,5 diméthyle pyrazine 10^{-5}M puis 10^{-4}M. Deux minutes entre chaque stimulation permettent à la préparation de récupérer à 100 %. La boucle est rincée plusieurs fois avec la solution de type Ringer après chaque stimulation. Pour vérifier le bon rinçage de la boucle, un « blanc » a parfois été réalisé. Cela a consisté à stimuler la préparation avec du Ringer chargé dans la boucle. Si la boucle a bien été rincée aucune réponse n'est attendue au niveau de la muqueuse olfactive.

La seconde condition s'enchaîne directement. Sans interrompre le flux, la solution physiologique est changée par une solution Ringer contenant un des quatre bloqueurs. La préparation est parcourue

préalablement par un flux de Ringer avec bloqueur pendant 10 minutes (seulement 3 minutes pour le MK571) avant de reproduire la séquence de stimulations décrite précédemment.

La troisième condition consiste à enchainer en basculant à nouveau sur la solution Ringer standard. La préparation est rincée pendant 20 minutes avant que soit effectuée une troisième et dernière séquence de stimulations avec les produits dilués dans le Ringer standard.

La stimulation avec une solution de KCl à 140mM provoque une dépolarisation non spécifique des neurones olfactifs ainsi que des cellules de soutien physiologiquement fonctionnels. L'application de KCl à 140mM au début de chaque condition nous renseigne donc sur la viabilité générale de la muqueuse olfactive.

La **Figure 24** reprend schématiquement le décours temporel du protocole de stimulation.

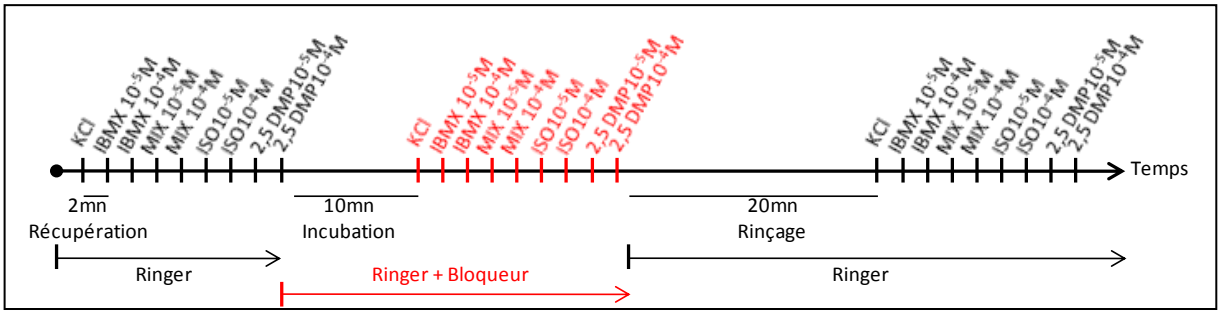


Figure 24: Déroulement temporel du protocole d'enregistrement des EOG

3. *Traitements et analyses des données*

Les traces d'EOG enregistrées sont converties d'un format (.iot) en un autre (.abf) compatible avec le logiciel Clampfit (version 8.2.0.235) d'Axon Instruments. Elles sont ensuite traitées avec ce même logiciel. Chaque enregistrement est calibré par rapport à la stimulation de 1mV appliquée au début de chaque enregistrement. L'amplitude maximale (Vmax) de l'EOG est mesurée grâce à un outil intégré de Clampfit.

Les traces d'EOG ainsi traitées sont transférées dans le logiciel Microcal Origin 5.0. A l'aide de ce logiciel, les traces sont normalisées sur leur amplitude maximale. Ce logiciel est également utilisé pour la composition de graphiques présentant les traces d'EOG.

Les calculs et les statistiques sur les données recueillies se font sous Microsoft Excel 2007.

Le seuil de significativité des tests est fixé à $p<0.05$. Un test t de Student bilatéral par séries appariées a été effectué entre la condition témoin et en présence d'un bloqueur.

E. Rétro-transcription et amplification via réactions en chaîne par polymérase (RT-PCR)

1. RT-PCR partir du tissu entier

a) Isolation de l'ARN messager

Les rats et les souris adultes, au moins 12 semaines, ont été profondément anesthésiés par une injection intra péritonéale de 150mg/kg de pentobarbital sodique. Les rats et les souris nouveau-nés, jusqu'au cinquième jour post-natal, ont été anesthésiés par hypothermie pendant 10 minutes à -20°C.

Les animaux ainsi anesthésiés ont été sacrifiés par décapitation. Des échantillons de foie et de l'épithélium olfactif récupérés au niveau du septum des deux côtés de la cavité nasale sont rapidement micro-disséqués, immédiatement placés dans un Ependorf certifié sans RNase et instantanément congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C.

L'extraction de l'ARNm a été effectuée à partir du tissu congelé en utilisant le mini Kit RNeasy Plus de Qiagen en suivant les instructions du fabricant. Le protocole consiste d'abord à lyser puis à homogénéiser les échantillons. Le lysat mélangé à de l'éthanol traverse une membrane de silice par centrifugation. L'ARN se fixe à la membrane quand le reste du lysat est évacué. L'ARN purifié est récupéré par rinçage de la membrane avec de l'eau pure.

A l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop 2000 Thermo scientific) la concentration (à 260 nm) et la pureté de l'échantillon est établie (Ratio 260 nm/280 nm).

b) Rétro-transcription

Le matériel pour la rétro-transcription provient du kit de synthèse d'ADN simple brin pour RT PCR superscript III (Invitrogen). Dans un premier temps 1,3µg d'ARN est mélangé avec des Oligo DT et des dNTP. Le mélange est incubé 5 minutes à 65°C puis plongé dans la glace pendant 1 minute. Ensuite, sont ajoutés le tampon 10X, $MgCl_2$, DTT, la RNase OUT et la superscript III RT. La synthèse de l'ADN complémentaire s'effectue avec un thermocycleur UNO II (Biometra) programmé comme suit : 45min à 50°C, 15min à 55°C et 15min à 70°C.

c) *Amplification via réaction en chaîne par polymérase*

Nous avons créé des amorces 100 % spécifiques à partir de l'application web Primer Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) qui ont été fabriquées sur commande par la compagnie Operon. Ces amorces ont été créées de façon à chevaucher une liaison exon-exon sur l'ADN complémentaire. De cette façon, en cas d'amplification de l'ADN génomique le brin obtenu sera plus long puisqu'il inclura un intron supplémentaire. Les séquences de ces amorces sont listées dans le **Tableau 11** pour le rat et dans le **Tableau 12** pour la souris.

Rat				
Gène		Séquence (5'->3')	Modèle	pb
MRP1 (Abcc1)	Sense	ATGTGACTCTCAAGGGCTCCGTGG	NM_022281.2	691
	Anti-sense	GTGCTGCTGTGCTGCTGGTTAGTA		
MDR1a (Abcb1a)	Sense	GAGTGAAAAGGTCGTCCAGGAAGCG	NM_133401.1	234
	Anti-sense	TCTCGCATGGTCACAGTTCATGAGC		
MDR1b (Abcb1b)	Sense	CCCAAAGTGACACTGGTGCCTCTG	NM_012623.2	564
	Anti-sense	GCCTGGAGCCCATAGCCCCTTTA		
Cyclophilin A (Cypa)	Sense	TGGCACTGGTGGCAAGTCCA	NM_017101	229
	Anti-sense	TGGACCCAAAACGCTCCATGGC		

Tableau 11: Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la PCR chez le rat

Souris				
Gène		Séquence (5'->3')	Modèle	pb
MRP1 (Abcc1)	Sense	AGCATTGTGCAGGCCAGCGT	NM_008576.2	822
	Anti-sense	CTCCGAGGCCAGGTCCTGCT		
MDR1a (Abcb1a)	Sense	CCTGAAACCCAGCGGCAGAACA	NM_011076.2	265
	Anti-sense	GCCTAGACCCTGTAGCCCCTTTCAC		
MDR1b (Abcb1b)	Sense	GTGTCCACAGAAAGCAAGACCAAGA	NM_011075.2	482
	Anti-sense	GGCGCCCATCGCCCCTTTAA		
Cyclophilin A	Sense	CATCCTAAAGCATACAGGTCCTG	NM_008907	165
	Anti-sense	TCCATGGCTTCCACAATGTT		

Tableau 12 : Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la PCR chez la souris

L'ADN complémentaire a été mélangé au Taq PCR Master Mix (Qiagen) puis placé dans un thermocycleur (UNO II Biometra) programmé de la façon suivante : 1min à 98°C; [30s à 98°C; 40s à 60°C; 1min à 72°C] séquence répétée 35 fois et finalement 5min à 72°C.

L'ADNc ainsi amplifié est placé sur un gel d'agarose 1.3 % contenant du bromure d'éthydium. La migration s'effectue par électrophorèse. Le résultat est révélé à l'aide d'un Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad).

2. RT-PCR à partir de cellules uniques

a) Récupération du tissu et dissociation cellulaire

La récupération de l'épithélium olfactif de rat et de souris adulte s'effectue comme décrit précédemment. Au lieu d'être plongée dans l'azote liquide la muqueuse fraichement récupérée est mise à incuber dans un tampon de dissociation basé sur celui de Hanks (Gibco) contenant 5 % de papaïne (Roche) avec agitation pendant 10minutes à 37°C. La muqueuse est ensuite rincée dans trois bains contenant du tampon de dissociation sans papaïne. Une fois rincée la muqueuse immergée est dilacérée dans une boîte de Pétri à l'aide de deux pinces de précision. Lorsque le tissu est totalement désagrégé, un volume de solution contenant les cellules en suspension est passé à travers un tamis cellulaire 40 µm en fibres de nylon (Falcon) et récupéré dans une chambre d'enregistrement possédant comme fond une lame de verre recouverte de polyethyleneimine (PEI, Sigma). Un volume de solution de type Ringer contenant de la fluorescein β-D-galactopyranoside à 2mM est mélangé au volume de cellules en suspension. La solution de cellules dissociées est laissée au repos pendant 1h pour laisser le temps aux cellules de se déposer sur la lame de verre ainsi qu'à la β-galactosidase d'hydrolyser la FDG. Cette incubation a lieu sur de la glace afin d'améliorer la survie des cellules et afin d'inhiber l'activité des MDR et des MRP.

b) Récupération de cellules de l'épithélium olfactif dissocié

La chambre d'enregistrement est placée sur le plateau d'un microscope inversé (Olympus IX70) couplé à un système d'imagerie pratiquement identique à celui décrit précédemment (Till Photonics polychrome IV). La préparation reçoit en permanence un flux de Ringer stérile. Après 10 minutes de rinçage les cellules fixées à la lame de verre sont observées en transmission et en fluorescence. Seuls les neurones olfactifs sont fluorescents puisqu'ils sont les seuls à avoir une activité β-galactosidase dans l'épithélium olfactif (Liberles and Buck, 2006). Les neurones sont en plus identifiés par leur morphologie (taille, dendrite et vésicule olfactive). Afin de récupérer un échantillon de neurones olfactifs d'une part et un autre de cellules non fluorescentes de l'autre, une électrode en verre en surpression est approchée de la cellule à l'aide d'un micromanipulateur (Burleigh, PCS 5000 series). Cette électrode en verre (Harvard apparatus, Borosillicate glass capillaries 1.5mm OD*0.86mm ID) a été étirée à l'aide d'une étireuse Flaming/Brown (Sutter Instrument Co. Modèle P-97) de façon à obtenir un diamètre interne à son extrémité de 8.5 µm. Juste avant d'être utilisée chaque électrode voit

sa pointe plongée dans du Ringer stérile afin de remplir celle-ci par capillarité. Ce volume de Ringer est expulsé une fois l'électrode introduite dans le milieu de cellules dissociées. La présence de Ringer dans la pointe et l'application d'une pression légèrement positive empêche l'éventuelle entrée passive de matériel génétique polluant lors du transfert de la pipette. Une cellule approchée par la pointe de la pipette va pouvoir être aspirée grâce à l'établissement d'une dépression obtenue par l'intermédiaire d'une seringue. L'électrode est ensuite retirée du milieu et sa pointe brisée dans un tube à essais contenant 3 µL de tampon de lyse à température proche de 0°C. Le contenu du tube est homogénéisé au vortex et centrifugé à 6000tr/min après la récupération de chaque cellule. Lorsqu'au minimum cinq cellules sont rassemblées dans le même tube, celui-ci est centrifugé 5 minutes à 10000/min dans une centrifugeuse réfrigérée à 6°C avant d'être stocké à -80°C. Trois échantillons sont ainsi récupérés. Un premier contenant un échantillon de neurones olfactifs, un second contenant toutes sortes de cellules non fluorescentes, à priori tout type cellulaire présent dans l'épithélium olfactif à l'exception des neurones olfactifs. Le troisième échantillon est constitué uniquement du milieu récupéré dans les mêmes conditions que les cellules isolées dans le but d'en faire un témoin négatif.

c) Rétro-transcription

L'ensemble des réactifs sont issus du kit de Superscript III first strand (Qiagen).Un premier mélange contenant des Oligo dT, des dNTP et des hexamères aléatoires est ajouté aux 3 µL du tampon de lyse contenant les cellules isolées précédemment. L'ensemble est incubé 5 minutes à 65°C dans un thermocycleur (Biorad, mini Opticon) avant d'être placé 1 minute dans la glace.

Un second mélange contenant du tampon de rétro transcription, des dTT, de la RNase OUT et de la superscript III est ajouté avant de replacer les échantillons dans le thermocycleur pendant 45 minutes à 50°C, puis 15 minutes à 55°C et finalement 15 minutes à 70°C avant d'être gardé dans la glace.

d) Amplification via réaction en chaîne par polymérase

Les paires d'amorces et du supermix de PCR SsoFast Evagreen (Bio-Rad) sont ajoutés à l'ADNc précédemment obtenu. Après mélange au *vortex* et centrifugation des échantillons les tubes sont placés dans un autre thermocycleur (Applied Bioscience, Stepone Plus). Le thermocycleur est programmé comme suit : 95°C pendant 30 secondes, puis 45 le cycle suivant, 95°C pendant 4secondes et 60°C pendant 30 secondes. Et finalement 95°C pendant 15s puis 1min à 55°C avant d'effectuer une courbe de fusion.

Résultats

III. Résultats

A. Test fonctionnel à la calcéine-AM

1. Difficultés rencontrées en imagerie par fluorescence

a) L'intensité du signal lumineux et les difficultés de chargement des sondes fluorescentes

Le chargement de sondes calciques fluorescentes par les cellules de la muqueuse olfactive du rat ou de la souris et en particulier par les neurones olfactifs s'est avéré particulièrement faible, nécessitant un traitement logiciel poussé pour distinguer le chargement cellulaire du bruit de fond.

Sur une préparation de muqueuse entière et sur une préparation en tranches nous avons appliqué jusqu'à 1h des sondes calciques telles que le Fluo3-AM, le Fluo4-AM, Calcium Green1-AM et le Fura2-AM entre 0,5 µM et 10 µM en présence de Pluronic 127 à 4 %, un agent tensioactif. Au niveau de l'épithélium olfactif, ces sondes sont connues pour s'accumuler principalement dans les neurones olfactifs (Ma and Shepherd, 2000). Vues de dessus, à la surface de l'épithélium, les cellules de soutien forment un pavage serré parsemé d'abouchements des canaux excréteurs des glandes de Bowman. Les vésicules olfactives qui mesurent entre 1 µm et 2 µm de diamètre affleurent sous la forme de boutons à la surface de l'épithélium olfactif entre la jonction de deux ou trois cellules de soutien. Un chargement en fluorophores trop faible permet à peine de les discerner parmi les cellules de soutien (**Figure 25**). Sur les tranches, perpendiculairement à sa surface, on peut observer la muqueuse olfactive dans toute son épaisseur. Malgré le fait que l'intégralité du neurone olfactif soit alors exposée, en particulier son corps cellulaire, le signal lumineux reste assez faible. Pour tenter d'obtenir un signal suffisamment intense, on peut augmenter le temps d'exposition de la préparation. Cette procédure a une limite : Les sondes calciques étant sensibles au blanchiment, un temps d'exposition trop long provoque une diminution de l'intensité de la fluorescence. L'effet est particulièrement sensible lorsqu'il est nécessaire d'effectuer une séquence d'acquisition de deux images par seconde pendant au moins dix secondes, ordre de grandeur pour saisir une réponse olfactive. Nous avons réussi à enregistrer une augmentation de l'intensité de fluorescence au niveau de la muqueuse olfactive en réponse à une application de KCl 140mM sur une préparation en tranche mais nous n'avons pas réussi à distinguer de variation de l'intensité de fluorescence en réponse à des stimuli olfactifs.

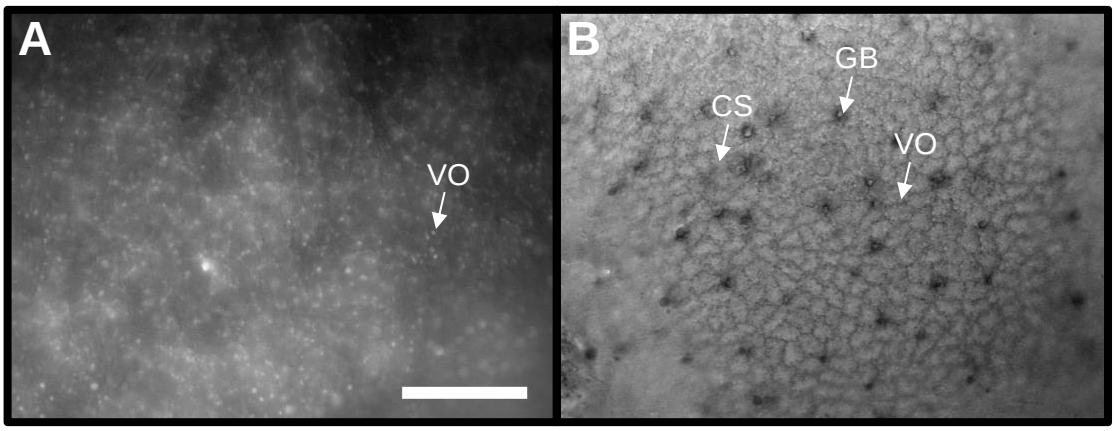


Figure 25 : Muqueuse olfactive de souris vue du dessus. [A] Image en fluorescence après 1h d'incubation avec du Fluo4-AM 5 µM. Les points les plus brillants sont les vésicules olfactives qui ont accumulé la sonde fluorescente. [B] Image en transmission. VO : vésicule olfactive. CS : cellule de soutien. GB : glande de Bowman. Echelle = 50 µm.

b) Mouvements intrinsèques de la préparation

Il a été difficile de suivre une cellule ou une région précise de la muqueuse olfactive au cours du temps. Bien que fixée au fond de la chambre d'enregistrement avec une ancre, la muqueuse olfactive entière présente sur une heure ce qui semble être de lents mouvements de rétractation et de gonflements. Le résultat est que la zone observée varie non seulement dans l'axe horizontal mais aussi dans l'axe vertical. Dans l'axe horizontal, un recadrage *a posteriori* était encore possible, mais rien n'était envisageable avec les changements de plan focal. Avec une amplitude plus faible, on retrouve ce phénomène sur les tranches qui confirme que la muqueuse se rétracte indépendamment du cartilage (**Figure 26**). Sur les tranches, plusieurs structures sont visibles. On distingue au centre le cartilage constitué de chondrocytes et plus extérieure, la *lamina propria* constituée de tissu conjonctif, des faisceaux d'axones, des vaisseaux sanguins et des acini des glandes de Bowman. L'épithélium olfactif est la couche la plus apicale. Au cours du temps, la position du fil de nylon de l'ancre reste inchangée et sert de point de repère spatial entre les deux images. Lorsque l'on compare une même tranche avec 60 minutes d'intervalle, on observe un déplacement de la surface de l'épithélium olfactif de 14 µm en moyenne vers le centre de la tranche, ce qui équivaut à la longueur du corps cellulaire d'un grand neurone olfactif. L'épaisseur de l'épithélium olfactif et celle du cartilage restent inchangées tandis que l'épaisseur de la *lamina propria* est diminuée. Afin d'enrayer ce phénomène, nous avons fait varier l'osmolarité, la température du bain, la composition du Ringer. Nous avons testé une composition de Ringer basée sur celle du mucus, un Ringer oxygéné et un Ringer contenant du glycérol à la place du sodium dans le but de réduire l'entrée passive de celui-ci et donc de prévenir le gonflement et la lyse des cellules (Ye et al., 2006). Aucune de ces manœuvres n'a apporté de solution aux problèmes de mouvements de la préparation.

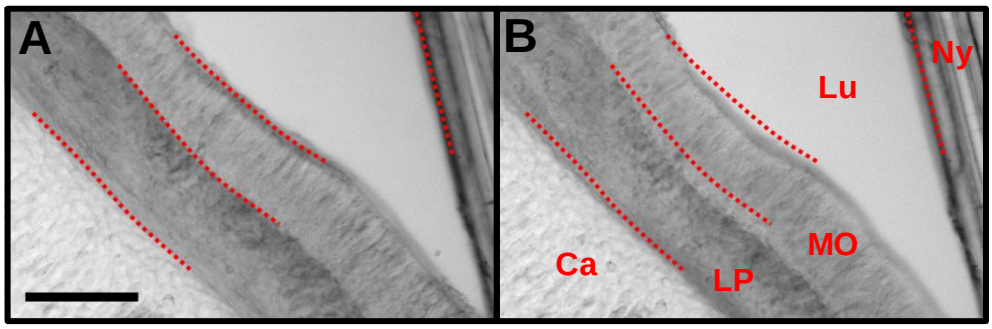


Figure 26 : Images en transmission d'une tranche coronale de la cavité nasale de souris nouveau-née. [A] A t0, les limites de la muqueuse olfactive, de la *lamina propria* et du cartilage sont délimitées par des pointillés rouges. Des pointillés sont tracés sur un fil de nylon de la lyre qui maintient la tranche comme repère statique. [B] Les limites dessinées à t0 sont reportées sur une image prise à t0+ 60 minutes. Ca : cartilage. LP : *Lamina Propria*. MO : muqueuse olfactive. Ny : fil de Nylon. Lu : lumière de la cavité nasale. Epaisseur de la tranche=100 µm. Echelle=100 µm

c) Maintien en survie de la préparation.

Pour observer l'accumulation de la calcéine-AM sur une préparation en tranche durant une période de 60 min, d'un point de vue de la survie, l'idéal aurait été de placer la préparation dans un bain de Ringer renouvelé en permanence. Malheureusement, cela aurait été très dispendieux en calcéine-AM et en substances pharmacologiques. Notre premier choix a donc été de plonger la préparation dans un bain statique contenant du Ringer et de la calcéine-AM pendant 15min, puis de changer progressivement le contenu de la chambre d'enregistrement par un Ringer contenant de la calcéine-AM et un bloqueur de MDR1 ou MRP1. Le problème avec cette approche est que le changement de bain par un Ringer contenant de la calcéine-AM seule provoque une accélération de la cinétique de chargement biaisant ainsi l'évaluation des effets de l'addition d'une substance pharmacologique.

Nous avons effectué plusieurs constatations pour nous assurer que la préparation dans son bain reste viable tout au long des enregistrements. Premièrement, nous avons utilisé des tranches présentant un état morphologique du cartilage, de la *lamina propria* et de l'épithélium olfactif intact au moins au niveau du septum. Nous avons pu constater qu'en dehors des effets de gonflements décrits précédemment, les tissus présents dans une tranche conservent leur intégrité anatomique au cours du temps lorsqu'ils sont maintenues dans une solution de type Ringer. D'autre part, une muqueuse olfactive entière, après 60 min d'incubation dans un bain statique de Ringer contenant une sonde fluorescente et soumis à un enregistrement EOG est toujours capable de répondre aux stimulations olfactives. De plus, dans une tranche laissée deux heures dans un bain de Ringer à température ambiante, la muqueuse olfactive est toujours capable d'accumuler la calcéine-AM 1 µM. Ceci indique

une activité métabolique fonctionnelle, c'est un signe de viabilité de la préparation. Le Trypan blue est une substance qui est exclue des cellules dont la membrane est intacte, tandis qu'elle s'accumule dans les cellules à la membrane endommagée. Il est fréquemment utilisé pour rendre compte de la viabilité cellulaire. Ainsi, nous avons utilisé une tranche conservée 60minutes dans du Ringer à température ambiante et ensuite placée 5 minutes dans du Trypan blue 0.4 %. Cette tranche ne présente pas de marquage au Trypan blue dans l'ensemble de la muqueuse olfactive ni dans les chondrocytes du cartilage. Par contre, et ceci est peut-être intéressant pour expliquer les variations d'épaisseur constatée plus haut, on trouve un fort marquage dans l'épaisseur de la couche de la *lamina propria* (**Figure 27**).

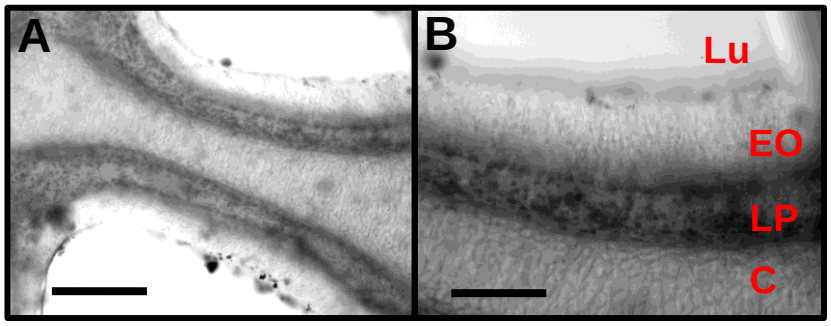


Figure 27 : Images en transmission d'une tranche coronale de la cavité nasale de rat nouveau-né. Cette tranche a été maintenue 2h dans un Ringer à température ambiante puis incubée 5 minutes en présence de Trypan blue 0.4 %. C : cartilage. LP : *lamina propria*. :EO : épithélium olfactif. Lu : lumière de la cavité nasale. Epaisseur de la tranche=100 µm. [A] Echelle=200 µm [B] Echelle=100 µm

d) Détermination de la longueur d'onde d'excitation optimale.

Selon les documents techniques, la calcéine chargée par des cellules a un optimum d'excitation autour de 488 nm. Cette valeur représente la longueur d'onde d'excitation qui produit une intensité de fluorescence maximale de la calcéine. Cette valeur peut en fait varier en fonction du matériel et des conditions d'utilisation. Nous avons donc voulu déterminer la valeur optimale dans nos propres conditions. Nous avons récupéré une tranche coronale de la cavité nasale de souris nouveau né d'une épaisseur de 100 µm. Nous l'avons incubée 60 minutes dans du Ringer en présence de calcéine 1 µM. Nous avons effectué un « spectrum », c'est-à-dire que nous avons effectué une série d'acquisitions d'images en partant d'une longueur d'onde d'excitation de 410 nm et en incrémentant celle-ci de 5 nm pour chacune des images suivantes jusqu'à 520 nm. On a recueilli une intensité de fluorescence maximale pour une longueur d'onde d'excitation de 480 nm. Nous avons donc conservé cette valeur pour toutes les acquisitions de l'étude qui va suivre.

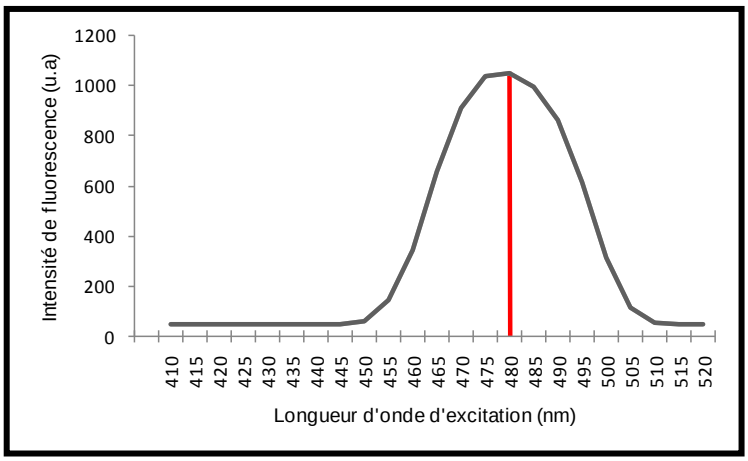


Figure 28: Spectrum de la calcéine. Détermination de la valeur maximale de la longueur d'onde d'excitation sur une tranche coronale de la cavité nasale de souris nouveau-née incubée 60 min en présence de calcéine-AM 1 µM. La valeur optimale de la longueur d'onde d'excitation est mesurée à 480 nm et est représentée par un trait rouge sur la figure. La longueur d'onde est exprimée en nanomètres (nm) et l'intensité de fluorescence recueillie en unité arbitraire (u.a).

2. Test à la calcéine-AM sur tranches coronales de la cavité nasale de rat et de souris

a) Localisation du chargement

Pendant 60 minutes d'incubation on observe que la calcéine-AM est chargée à différents degrés dans la plupart des tissus de la paroi nasale. Ainsi on peut observer un faible marquage des chondrocytes du cartilage, un marquage plus intense dans la *lamina propria* où on distingue les faisceaux d'axones, des glandes de Bowman ainsi que des capillaires. La muqueuse respiratoire, le bulbe olfactif et l'organe voméronasal sont des tissus qui chargent bien la calcéine-AM (non montrés). L'ensemble de la muqueuse olfactive charge la calcéine-AM, avec une bande de 60 µm à 100 µm bien plus intensément marquée que le reste (**Figure 29**). Dans cette bande on peut distinguer parfois les neurones olfactifs des cellules de soutien. Cela n'a pas été le cas pour toutes les tranches étudiées, c'est pourquoi, pour quantifier le chargement de la calcéine-AM, nous avons sélectionné une région d'intérêt (ROI) incluant toute l'épaisseur de la muqueuse olfactive sur une longueur d'une centaine de micromètres (**Figure 30**). Ce ROI est délimité dans la partie dorsale du septum juste avant la courbure concave du toit de la cavité nasale.

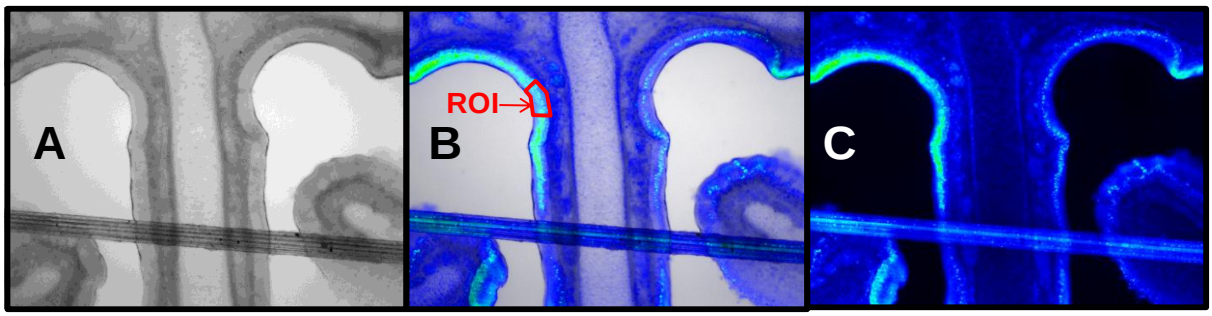


Figure 29 : Images d'une tranche coronale de la cavité nasale de rat nouveau-né incubée 60minutes en présence de calcéine-AM 1 µM. [A] Image en transmission. [B] Superposition de l'image en transmission et en fluorescence. [C] Image en fluorescence. ROI : exemple de région d'intérêt délimitée pour quantifier l'intensité de fluorescence. Epaisseur de la tranche=100 µm .Echelle=500 µm.

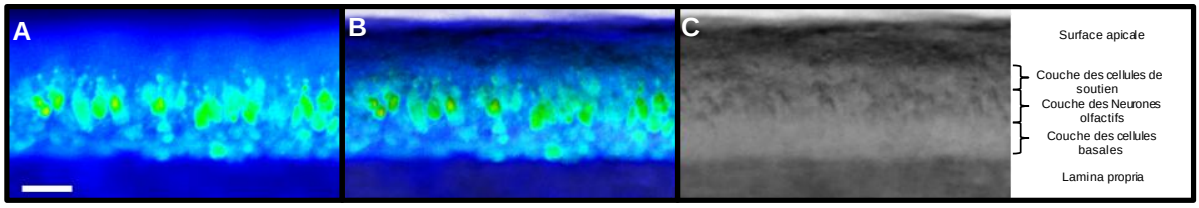


Figure 30 : Agrandissement centré sur la muqueuse olfactive obtenu à partir d'une tranche coronale de la cavité nasale de rat nouveau-né. La tranche a été incubée 1h en présence de calcéine-AM 1 µM. [A] image en fluorescence. [B] Superposition de l'image en fluorescence et de l'image en transmission. [C] Image en transmission. Epaisseur de la tranche=100 µm. Echelle=25 µm

b) Variabilité entre les échantillons

Dans la condition témoin, la valeur moyenne de l'intensité de la fluorescence dans la muqueuse olfactive mesurée à partir d'un ROI est relativement variable d'un individu à l'autre. Afin d'obtenir une intensité de fluorescence suffisante pour distinguer la muqueuse olfactive et faire le point à sa surface, nous avons attendu 8 minutes de préincubation. Ainsi, chez la souris nouveau-née, sur la première image obtenue après préincubation (t0), on a pu observer une intensité de fluorescence moyenne jusqu'à 6.0 fois supérieure d'un individu à l'autre et jusqu'à 3.5 fois à t60. La variabilité entre deux échantillons est en moyenne de 52 % à t0 et de 39.26 % à t60. Chez le rat nouveau-né, à t0, on a pu constater des valeurs jusqu'à 2.9 fois supérieures d'un individu à l'autre et jusqu'à 4.1 fois à t60. La variabilité est en moyenne de 31 % à t0 et de 36.78 % à t60 (**Tableau 13**).

Chez la souris après préincubation, l'intensité de la fluorescence dans la muqueuse olfactive est en moyenne de 185.73 unités arbitraires (u.a) tandis qu'elle est de 118.76 chez le rat. 60 minutes après, l'intensité de la fluorescence est de 744.44 u.a en moyenne chez la souris et de 665.41 u.a en moyenne chez le rat.

		Intervalle	Rapport max/min	Moyenne	Variabilité relative (%)	n
T0	Souris	76.11-453.57	5.96	185.73 (±97.09)	52.28	16
	Rat	66.16-192.78	2.91	118.76 (±36.72)	30.92	19
T60	Souris	371.20-1276.67	3.44	744.54 (±292.27)	39.26	16
	Rat	261.45-1077.85	4.12	665.41 (±244.70)	36.78	19

Tableau 13 : Variabilité de l'intensité de la fluorescence. Intensité de la fluorescence mesurée à partir de la muqueuse olfactive de rat et de souris après 8 minutes d'incubation (t0) et 60 minutes plus tard (t60).

Une fois déterminé, le ROI est reporté le plus fidèlement possible sur chaque image de la même tranche prises à t0, t15, t30, t45 et t60. On extrait de chaque ROI la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence en unité arbitraire que l'on rapporte en ordonnée d'un graphique avec le temps en minutes pour abscisse. On calcule ensuite une régression linéaire qui montre un coefficient de détermination (R^2) égale à 0.99. L'évolution de l'intensité de fluorescence peut donc être considérée comme linéaire. Le calcul de la pente de la droite obtenue représente la vitesse de la cinétique. Chez la souris, à partir de 16 échantillons, la vitesse moyenne de la cinétique de chargement de la calcéine par la muqueuse olfactive dans la condition témoin est de 9.26 u.a/min. Elle est légèrement plus faible pour le rat avec une vitesse moyenne de 9 u.a/min déterminée à partir de 19 échantillons (**Figure 31**).

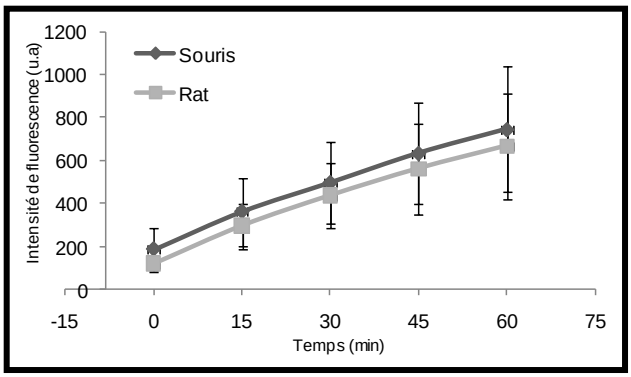


Figure 31 : Evolution de l'intensité moyenne de la fluorescence dans la muqueuse olfactive de rat et de souris en fonction du temps. La fluorescence est mesurée en unité arbitraire sur une échelle de 4096 valeurs. Le temps est mesuré en minutes. Les valeurs sont des moyennes obtenues à partir de 16 échantillons pour la souris et de 19 échantillons chez le rat. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

3. *Effet de bloqueurs de MDR 1 et de MRP1 sur le chargement de la calcéine chez la souris nouveau-née*

Nous avons voulu tester l'activité de transport de MDR1 et de MRP1, transporteurs de xénobiotiques, dans l'épithélium olfactif de souris nouveau-née. Pour cela nous avons utilisé le vérapamil et la cyclosporine A comme bloqueurs spécifiques de MDR1. Pour bloquer MRP1 nous avons utilisé le MK571 et le probénécide. Nous avons quantifié l'incorporation de la calcéine-AM 1 µM au cours du temps dans une condition témoin que l'on a comparée à une condition en présence d'un bloqueur. La concentration choisie pour chaque bloqueur a d'abord été choisie en fonction de la littérature. Nous avons ensuite doublé ces concentrations afin de mettre en évidence l'effet de la concentration sur l 'accumulation et pour mettre en évidence une possible différence de sensibilité à ces bloqueurs chez le Rat et la Souris.

Que ce soit en présence de vérapamil (**Figure 32**A), de cyclosporine A (**Figure 33**A), de MK571 (**Figure 34**A) ou de probénécide (**Figure 35**A), après préincubation de la préparation avec calcéine-AM 1 µM on observe une plus forte intensité de fluorescence dans la muqueuse olfactive en comparaison avec un témoin. Cet écart se creuse au cours de l'incubation et la différence est clairement visible à t60. Lors de certains enregistrements en présence de bloqueurs, avec nos paramètres, l'intensité de fluorescence a pu saturer le capteur de la caméra CCD. Afin que les valeurs moyennes relevées ne soient pas biaisées nous n'avons exploité que les enregistrements présentant des ROI avec au maximum 5 % de pixels saturés.

Des ROI sont délimités pour chaque tranche. Lorsque l'on trie avec un histogramme les pixels inclus dans chaque ROI en fonction de leur intensité de fluorescence on observe plusieurs pics. Ces pics traduisent l'hétérogénéité du chargement de la calcéine-AM dans l'ensemble de la muqueuse olfactive. Dans la condition témoin, on remarque que l'augmentation de la durée d'incubation, qui se traduit par une augmentation de l'intensité de la fluorescence, affecte de façon relativement homogène l'ensemble des pixels. Ainsi, au bout de 60 minutes d'incubation l'ensemble des pixels se répartissent sur une gamme dynamique relativement restreinte. Pour le vérapamil (**Figure 32**B), comme pour la cyclosporine A (**Figure 33**B), le MK571 (**Figure 34**B) et le probénécide (**Figure 35**B) on observe que l'ensemble des pixels subit une augmentation de leur intensité de fluorescence plus importante que dans la condition témoin. Cette augmentation est hétérogène, certains pixels sont beaucoup plus affectés par la présence d'un bloqueur. Cela se traduit par une fraction de l'ensemble des pixels atteignant des valeurs d'intensité extrêmement élevée sur notre échelle de valeurs. Le résultat global est une gamme d'intensités très étendue.

Lorsque l'on mesure l'intensité moyenne de la fluorescence à partir de ROI en fonction du temps on obtient une cinétique du chargement de la calcéine-AM. A partir des cinq valeurs reportées sur le graphique on calcule une régression linéaire. Si le coefficient de détermination est supérieur à 0.90, la cinétique est considérée linéaire et on extrait la pente qui représente la vitesse de la cinétique de chargement de la calcéine. Dans les exemples présentés, elle est de18u.a/min en présence de vérapamil 200 µM contre 7.3u.a/min dans la condition témoin (**Figure 32**C), elle est de 22.3u.a/min en présence de cyclosporine A 5 µM contre 6u.a/min dans la condition témoins(**Figure 33**C), elle est de 28u.a/min en présence de MK571 25 µM contre 7.6u.a/min dans la condition témoin (**Figure 34**C) et elle est de 22u.a/min en présence de probénécide 2.5mM contre 14.3 u.a/min dans la condition témoin (**Figure 35**C).

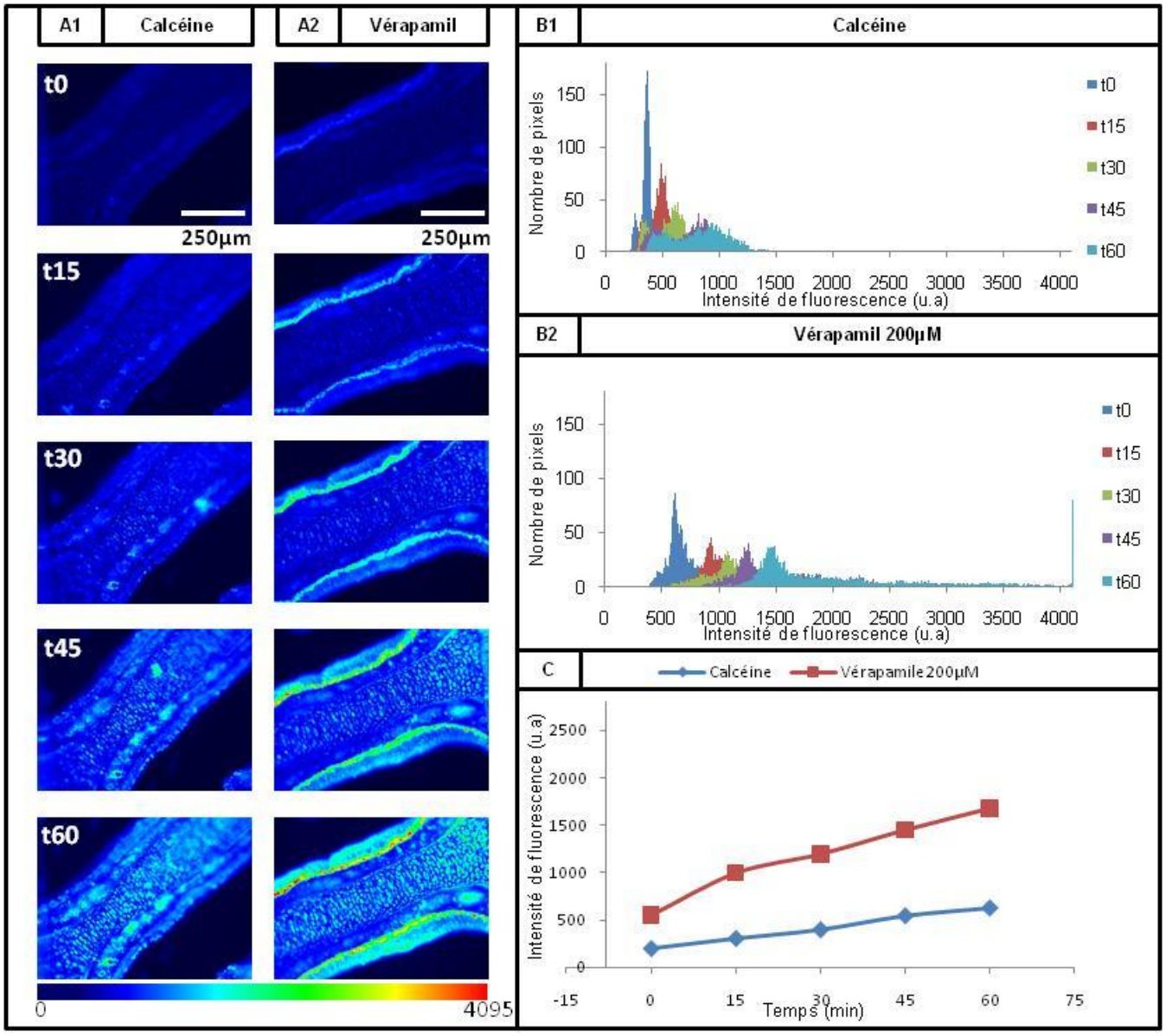


Figure 32 : Effet du vérapamil 200 µM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris nouveau-née. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1] et en présence de calcéine AM 1 µM + vérapamil 200 µM [A2]. Les deux tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes de préincubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1] et en présence de calcéine AM 1 µM + vérapamil 200 µM [B2]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

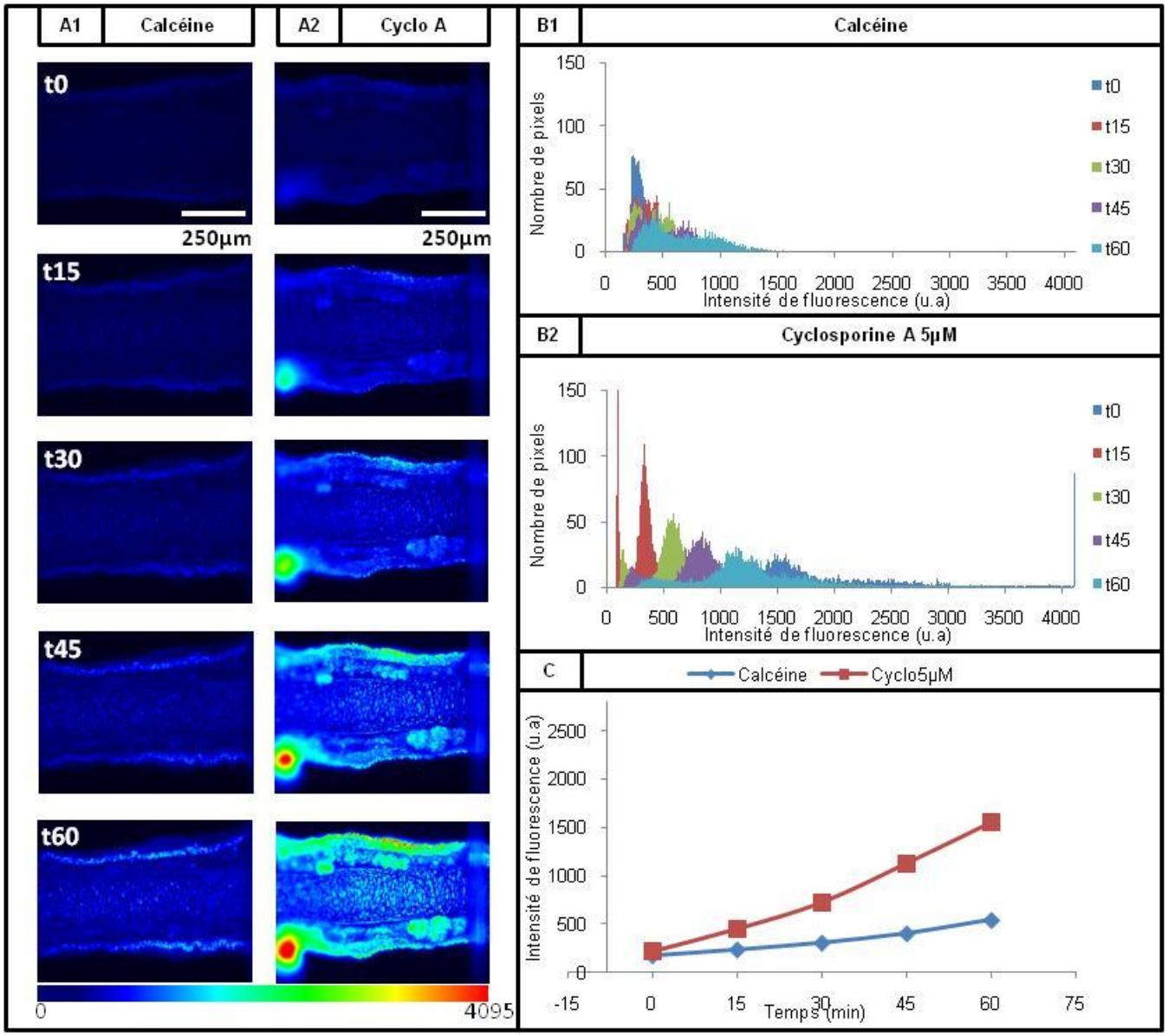


Figure 33 : Effet de la cyclosporine A 5 µM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris nouveau-née. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1] et en présence de calcéine AM 1 µM + cyclosporine A (cyclo A) 5 µM [A2]. Les deux tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes de préincubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1] et en présence de calcéine AM 1 µM + cyclosporine A 5 µM [B2]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

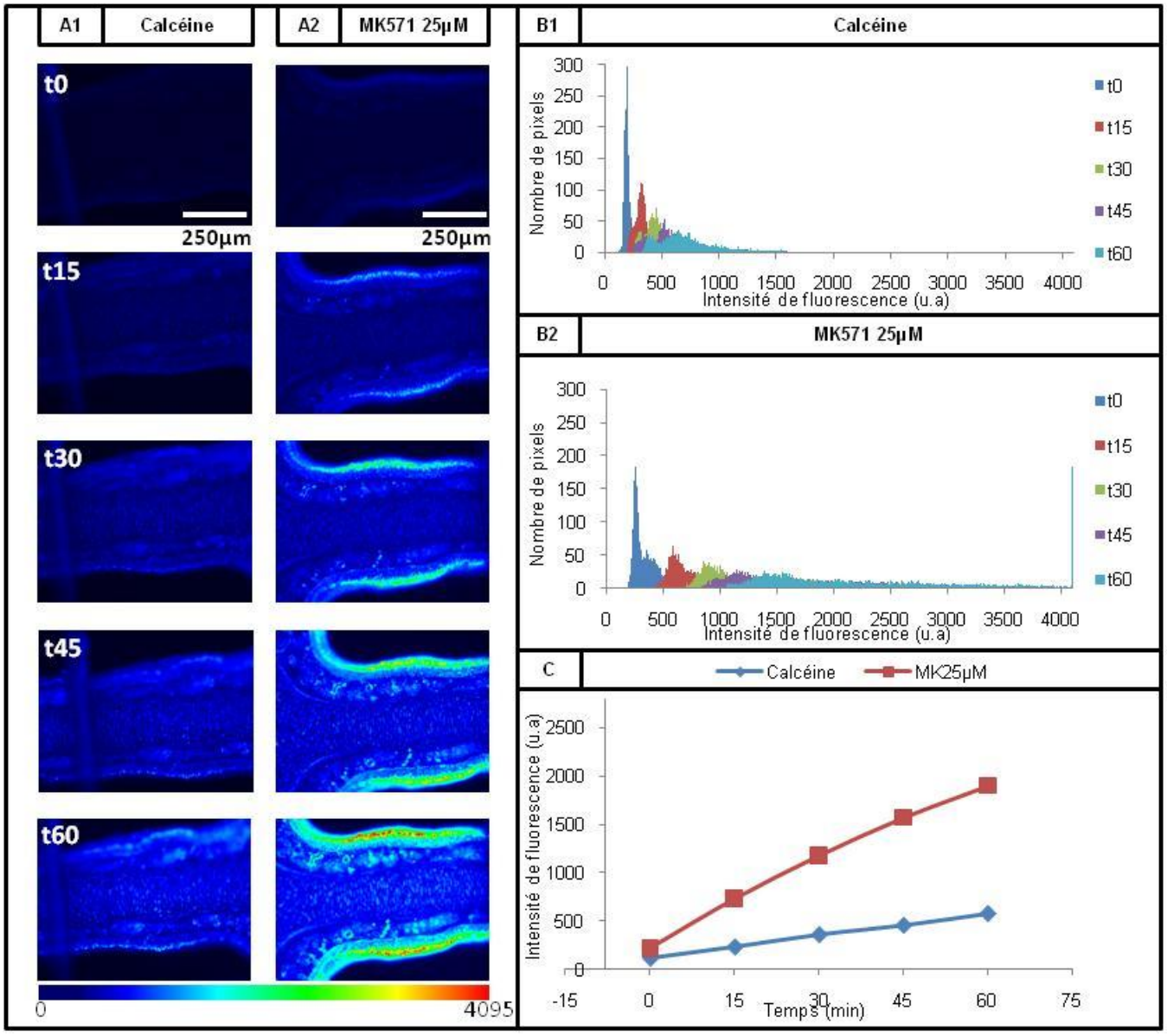


Figure 34 : Effet du MK571 25 µM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris nouveau-née. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1] et en présence de calcéine AM 1 µM + MK571 25 µM [A2]. Les deux tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes de préincubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1] et en présence de calcéine AM 1 µM + MK571 25 µM [B2]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

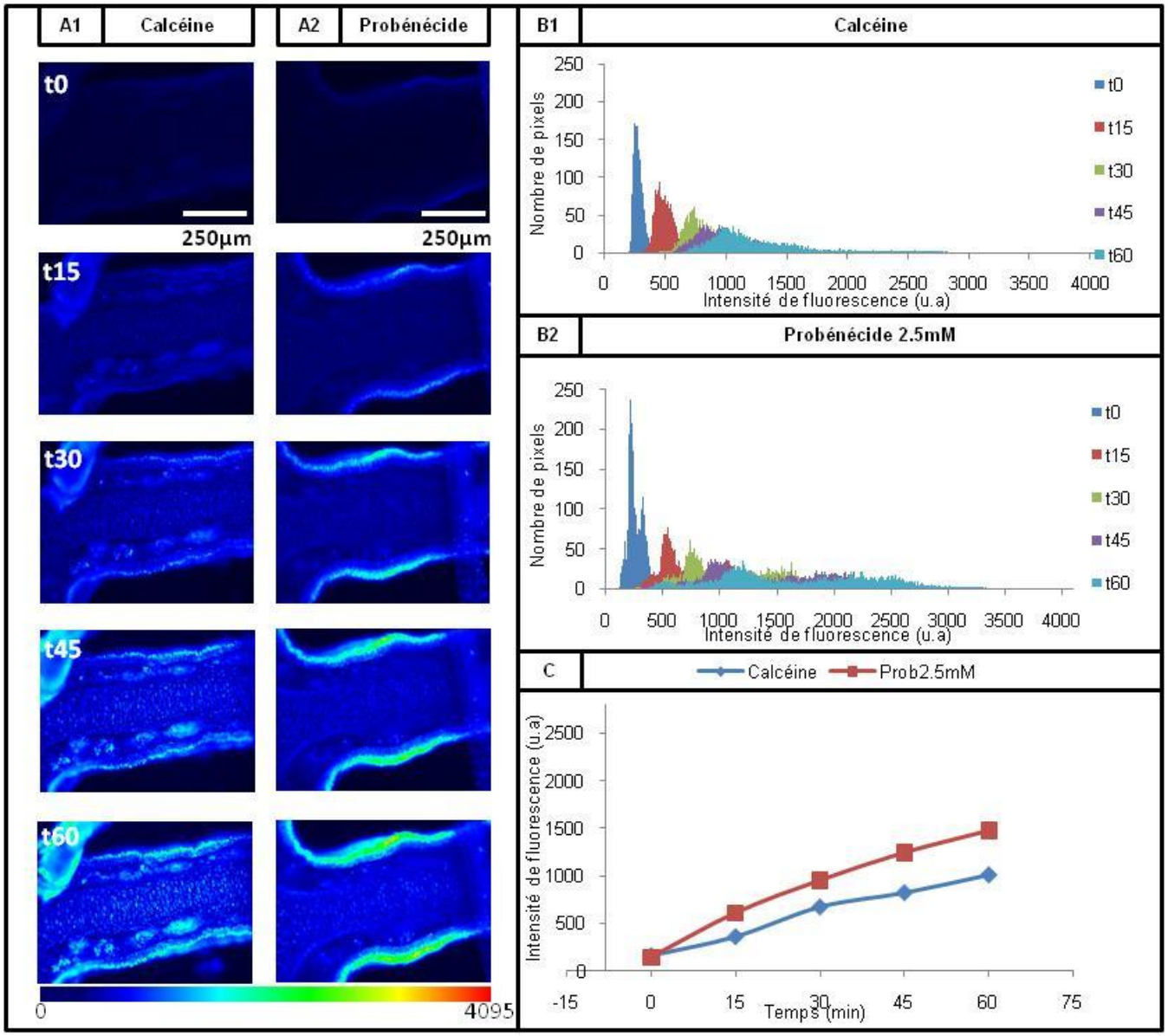


Figure 35 : Effet du probénécide 2.5mM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris nouveau-née. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1] et en présence de calcéine AM 1 µM + probénécide (prob) 2.5mM [A2]. Les deux tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes de préincubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1] et en présence de calcéine AM 1 µM + probénécide 2.5mM [B2]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

a) Récapitulatif

Lorsque l'on fait la moyenne de l'intensité de la fluorescence recueillie pour chaque ROI à t0, t15, t30, t45, et t60 dans une condition donnée on obtient une évolution moyenne du chargement de calcéine pour cette condition. On observe ainsi que le vérapamil et la cyclosporine A, des bloqueurs de

MDR1 aussi bien que le MK571 et le probénécide, des bloqueurs de MRP1, augmentent la vitesse d'incorporation de calcéine par la muqueuse olfactive (**Figure 40**). L'augmentation de la concentration de bloqueur, mise à part pour le MK571 où l'effet est similaire entre 25 µM et 50 µM, accélère la vitesse de la cinétique d'incorporation. L'effet des bloqueurs est donc dépendant de sa concentration. Dans le cas du MK571, la concentration saturante est peut-être atteinte dès 25 µM. La présence d'un bloqueur peut provoquer une accélération de la cinétique de chargement de 1.6 fois pour le probénécide 2.5mM à 4.2 fois pour le MK571 25 µM (**Figure 41**).

L'effet du MK571 sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris nouveau-née est significatif (**Tableau 14**). Cet effet est le plus fort parmi ceux des quatre bloqueurs testés. A une concentration de 25 µM la cinétique moyenne de chargement calculée à partir de 3 échantillons est de 29.40u.a/min, soit en moyenne 4.17 fois la valeur des témoins respectifs (**Tableau 15**). Le fait d'augmenter la concentration de MK571 de 25 µM à 50 µM n'augmente pas son effet sur la cinétique de chargement (**Figure 36**). Ainsi, à 50 µM la vitesse de chargement moyenne obtenue à partir de 4 échantillons est de 28.31 UA par minute, soit en moyenne 3.3 fois la valeur du témoin.

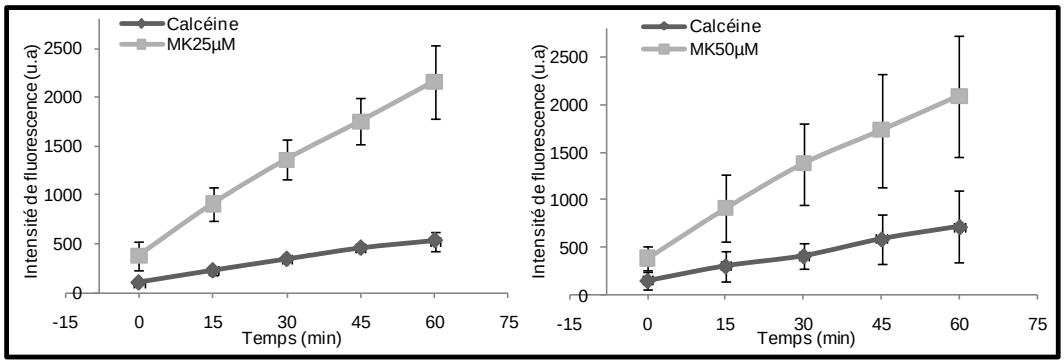


Figure 36 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 3 tranches coronales de la cavité nasale de souris nouveau-née incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de MK571 25 µM, de 4 tranches incubées avec calcéine-AM en présence de MK571 50 µM et de leur condition contrôle respective avec uniquement calcéine-AM 1 µM. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095.

Après le MK571, c'est la cyclosporine A qui a l'effet le plus marqué. Cet effet est significatif seulement à 10 µM (**Tableau 14**) avec une vitesse de chargement moyenne obtenue à partir de 6 échantillons de 25.12 u.a/min, soit en moyenne 2.9 celle du contrôle (**Tableau 15**). A 5 µM, la vitesse de chargement moyenne obtenue à partir de 3 échantillons est pourtant de 17.90 UA/min, soit en moyenne 2.2 fois la valeur du contrôle. Il y a donc un effet de la cyclosporine A dépendant de la concentration (**Figure 37**)

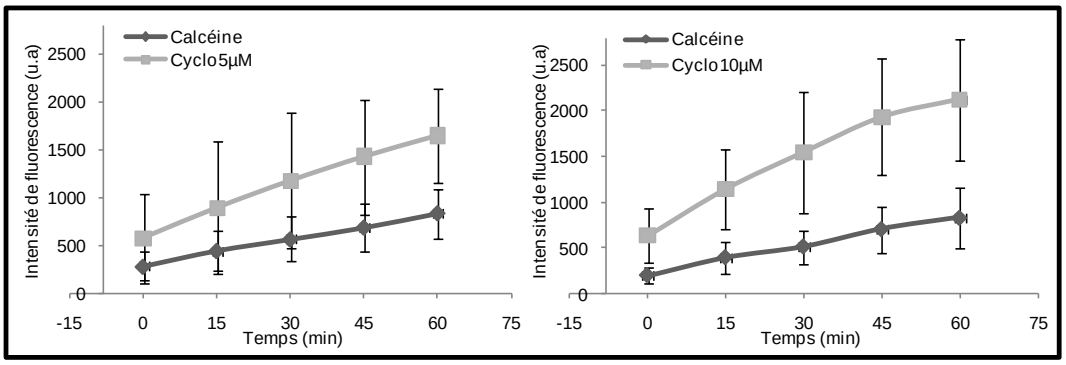


Figure 37 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 3 tranches coronales de la cavité nasale de souris nouveau-née incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de cyclosporine A (cyclo) 5 µM, de 6 tranches incubées avec calcéine-AM en présence de cyclosporine A 10 µM et de leur condition contrôle respective avec uniquement calcéine-AM 1 µM. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

Comme pour la cyclosporine A, l'effet du probénécide n'est significatif que pour une concentration de 5mM (**Tableau 14**), avec une vitesse moyenne obtenue à partir de 3 échantillons de 23.63 UA/min, soit en moyenne 2.6 fois la valeur du contrôle (**Tableau 15**). En présence de probénécide 2.5mM la vitesse de chargement moyenne obtenue à partir de 3 échantillons est pourtant de 14.78 UA/min, soit en moyenne 2.6 fois la valeur du contrôle (**Figure 38**).

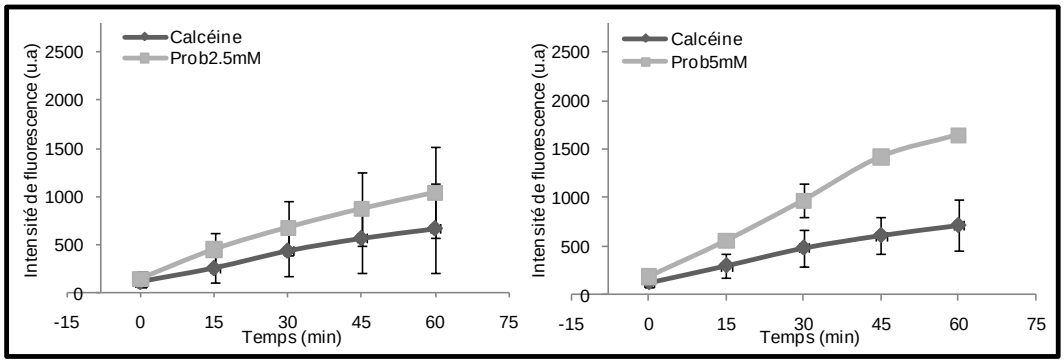


Figure 38 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 3 tranches coronales de la cavité nasale de souris nouveau-née incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de probénécide (prob) 2.5mM, en présence de probénécide 5mM et de leur condition contrôle respective avec uniquement calcéine-AM 1 µM. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

L'effet du vérapamil n'est significatif qu'à une concentration de 200 µM (**Tableau 14**). Avec une vitesse de chargement moyenne obtenue à partir de 3 échantillons de 28.28 u.a/min, soit en moyenne

2.4 fois la valeur du contrôle (**Tableau 15**). Avec une concentration de 100 µM, la vitesse de chargement moyenne obtenue à partir de 3 échantillons de 12.64 u.a/min, soit en moyenne, 1.6 fois plus rapide que le contrôle (**Figure 39**).

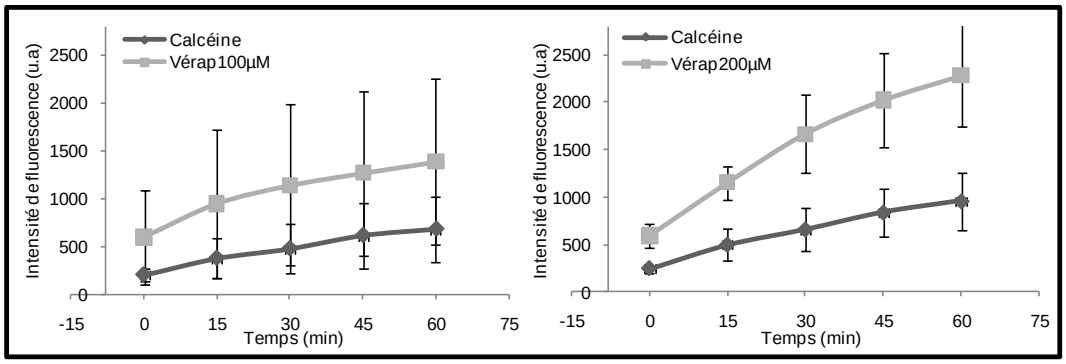


Figure 39 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 3 tranches coronales de la cavité nasale de souris nouveau-née incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de vérapamil (vérap) 100 µM, de vérapamil 200 µM et de leur condition contrôle respective avec uniquement calcéine-AM 1 µM. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

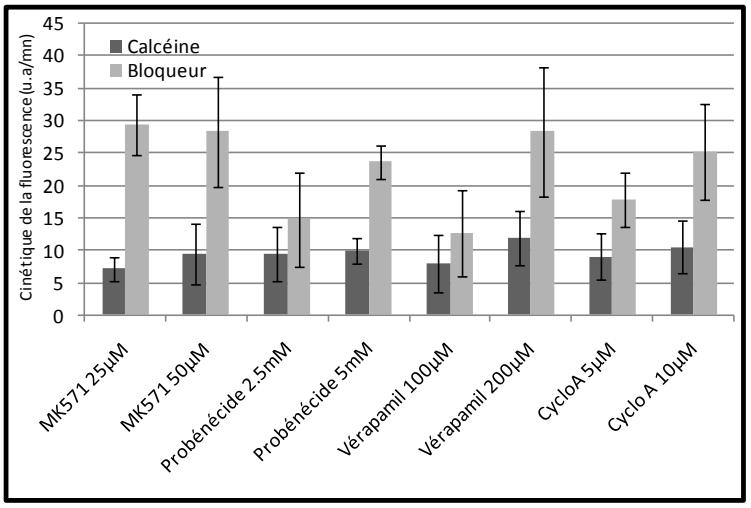


Figure 40 : Chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive en fonction du temps. Valeurs moyennes avec ou sans bloqueur obtenues sur les tranches coronales de la cavité nasale de souris nouveau-née. Le chargement est exprimé en intensité de la fluorescence par minute. Les barres d'erreur représentent l'écart type. (Cyclo A = cyclosporine A)

Bloqueur	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec bloqueur	Variabilité relative (%)	p	n
MK571 25µM	7.21 (±1.83)	25.42	29.40 (±4.76)	16.18	0.0069	3
MK571 50µM	9.45 (±4.72)	50.01	28.31(±8.52)	30.09	0.0044	4
Probénécide 2.5mM	9.48 (±4.27)	45.01	14.78 (±7.20)	48.73	0.1836	3
Probénécide 5mM	9.95 (±2.05)	20.56	23.63 (±2.28)	11.25	0.0187	3
Vérapamil 100µM	7.95 (±4.44)	55.91	12.64 (±6.66)	52.64	0.2486	3
Vérapamil 200µM	11.86 (±4.20)	35.44	28.28 (±9.92)	35.07	0.0388	3
Cyclosporine A 5µM	9.02 (±3.54)	39.25	17.90 (±4.16)	23.22	0.1404	3
Cyclosporine A 10µM	10.52 (±4.10)	38.94	25.12 (±7.38)	29.37	0.0080	6

Tableau 14 : Chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris nouveau-née. Valeurs exprimées en intensité de la fluorescence par minute. Variabilité relative= (écart type/moyenne)*100. Statistique : Test de Student bilatéral par paires, avec seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$. n=effectif.

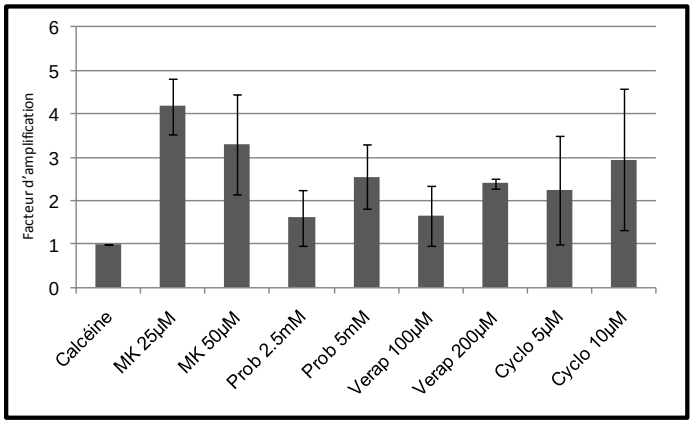


Figure 41 : Rapport moyen du chargement de la calcéine-AM en présence d'un bloqueur sur le chargement de la calcéine-AM dans la condition contrôle chez la souris nouveau-née. Les barres d'erreur représentent l'écart type. (Verap=vérapamil, Prob=probénécide, Cyclo= cyclosporine A)

Bloqueur	Moyenne	Variabilité relative (%)	Intervalle	Rapport max/min	n
Témoin	1.00	-	-	-	16
MK571 25µM	4.17 (±0.64)	15.29	3.68-4.89	1.33	3
MK571 50µM	3.30 (±1.16)	35.00	2.53-5.00	1.98	4
Probénécide 2.5mM	1.60 (±0.64)	39.87	1.00-2.27	2.27	3
Probénécide 5mM	2.56 (±0.74)	28.90	1.73-3.16	1.83	3
Vérapamil 100µM	1.65 (±0.68)	41.52	1.18-2.44	2.06	3
Vérapamil 200µM	2.39 (±0.11)	4.69	2.27-2.48	1.09	3
Cyclosporine A 5µM	2.25 (±1.25)	55.53	1.33-3.68	2.76	3
Cyclosporine A 10µM	2.95 (±1.64)	55.51	1.47-4.82	3.29	6

Tableau 15 : Rapport moyen du chargement de la calcéine-AM en présence d'un bloqueur sur le chargement de la calcéine-AM dans la condition contrôle chez la souris nouveau-née. Variabilité relative= (écart type/moyenne)*100. n=effectif.

4. Effet de bloqueurs de MDR 1 et de MRP1 sur le chargement de la calcéine chez le rat nouveau-né

Comme pour la souris, nous avons utilisé le vérapamil et la cyclosporine A, des bloqueurs spécifiques de MDR1, le MK571 et le probénécide, des bloqueurs spécifiques de MRP1, pour mettre en évidence l'activité de transport de xénobiotiques de ces deux protéines dans l'épithélium olfactif de rat nouveau-né. Nous les avons appliqués dans les mêmes conditions et aux mêmes concentrations.

Sur les tranches de rat nouveau-né, on observe une localisation du chargement de la calcéine similaire à celle observée chez la souris. Le cartilage est faiblement fluorescent, le tissu conjonctif de la *lamina propria* aussi. Dans la *lamina propria*, il y a un marquage fluorescent plus fort des faisceaux d'axones, des glandes de Bowman et des capillaires. La muqueuse olfactive, dans son ensemble, est la partie la plus fluorescente de la tranche. Cette fluorescence est en général plus faible chez le rat nouveau-né que chez la souris nouveau-née, et ce, quelque soit la condition. Comme chez la souris, les effets du vérapamil (**Figure 42**A), de la cyclosporine A (**Figure 43**A), du MK571 (**Figure 44**A) et du probénécide (**Figure 45**A), se manifestent par une plus forte intensité de la fluorescence dans la muqueuse olfactive en comparaison avec le témoin. Les effets des bloqueurs sont aussi de plus faible ampleur chez le rat.

Comme chez la souris, à l'intérieur d'un ROI, on a aussi une population hétérogène de pixels. Ces populations se manifestent par des pics dans un histogramme où sont triés les pixels en fonction de leur intensité de fluorescence. Dans la condition témoin, l'intensité de la fluorescence de chaque pixel évolue de façon relativement homogène et on retrouve comme chez la souris une gamme d'intensité relativement faible après 60 minutes d'incubation. En présence de vérapamil (**Figure 42**B), de cyclosporine A (**Figure 43**B), de MK571 (**Figure 44**B) et de probénécide (**Figure 45**B), les pics représentant les populations de pixels s'étalent plus au cours du temps que dans la condition témoin. L'effet sur l'ensemble des pixels présents dans le ROI apparait donc hétérogène. Ainsi les intensités des pixels se répartissent sur une gamme de valeurs très étendue, jusqu'à des valeurs très élevées. Comparativement à la souris, chez le rat nous avons rencontré plus rarement des cas de saturation .

Les effets des bloqueurs se manifestent aussi sur la cinétique de chargement. En effet, la vitesse de la cinétique recueillie à partir des ROI de t0 jusqu'à t60 en présence de bloqueur est assez régulièrement supérieure à celle enregistrée chez les témoins. Dans les exemples présentés, elle est de 9u.a/min en présence de vérapamil 200 µM contre 5.6u.a/min dans la condition témoin (Figure 42C). En présence de cyclosporine A 5 µM par contre elle est de 13u.a/min contre 14.3u.a/min dans la condition témoin (Figure 43C). La cyclosporine A 5 µM ne semble pas avoir d'effet sur la cinétique

pour cet échantillon. On observe tout de même qu'après incubation et jusqu'à t60 l'intensité de la fluorescence en présence du bloqueur est supérieure à celle du témoin. En présence de MK571 25 µM, la vitesse de la cinétique est de 17.3u.a/min contre 10u.a/min dans la condition témoin (Figure 44C) et elle est de 17u.a/min en présence de probénécide 2.5mM contre 11.6u.a/min dans la condition témoin (Figure 45C).

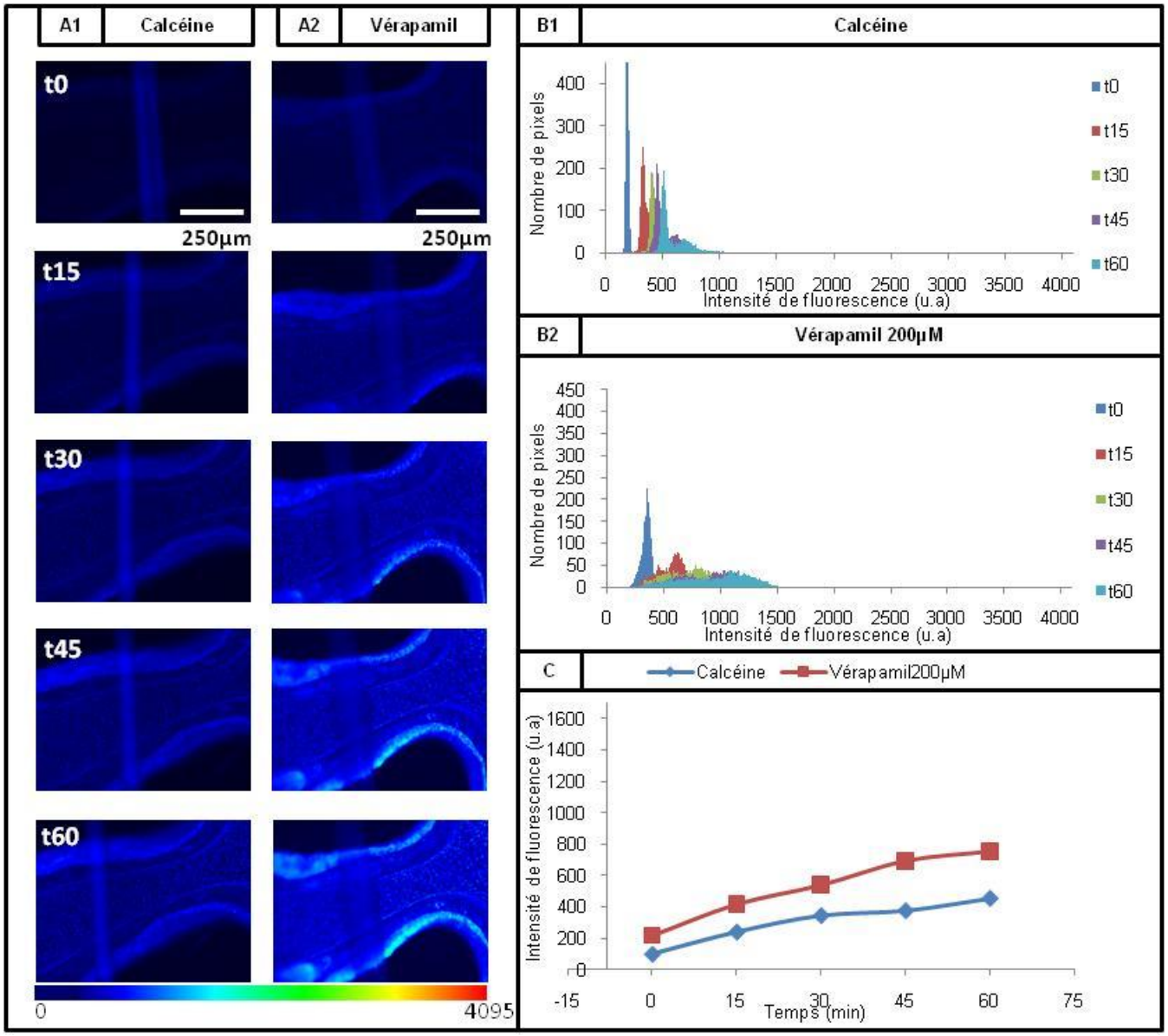


Figure 42 : Effet du vérapamil 200 µM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de rat nouveau-né. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1] et en présence de calcéine AM 1 µM + vérapamil 200 µM [A2]. Les deux tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes de préincubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1] et en présence de calcéine AM 1 µM + vérapamil 200 µM [B2]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

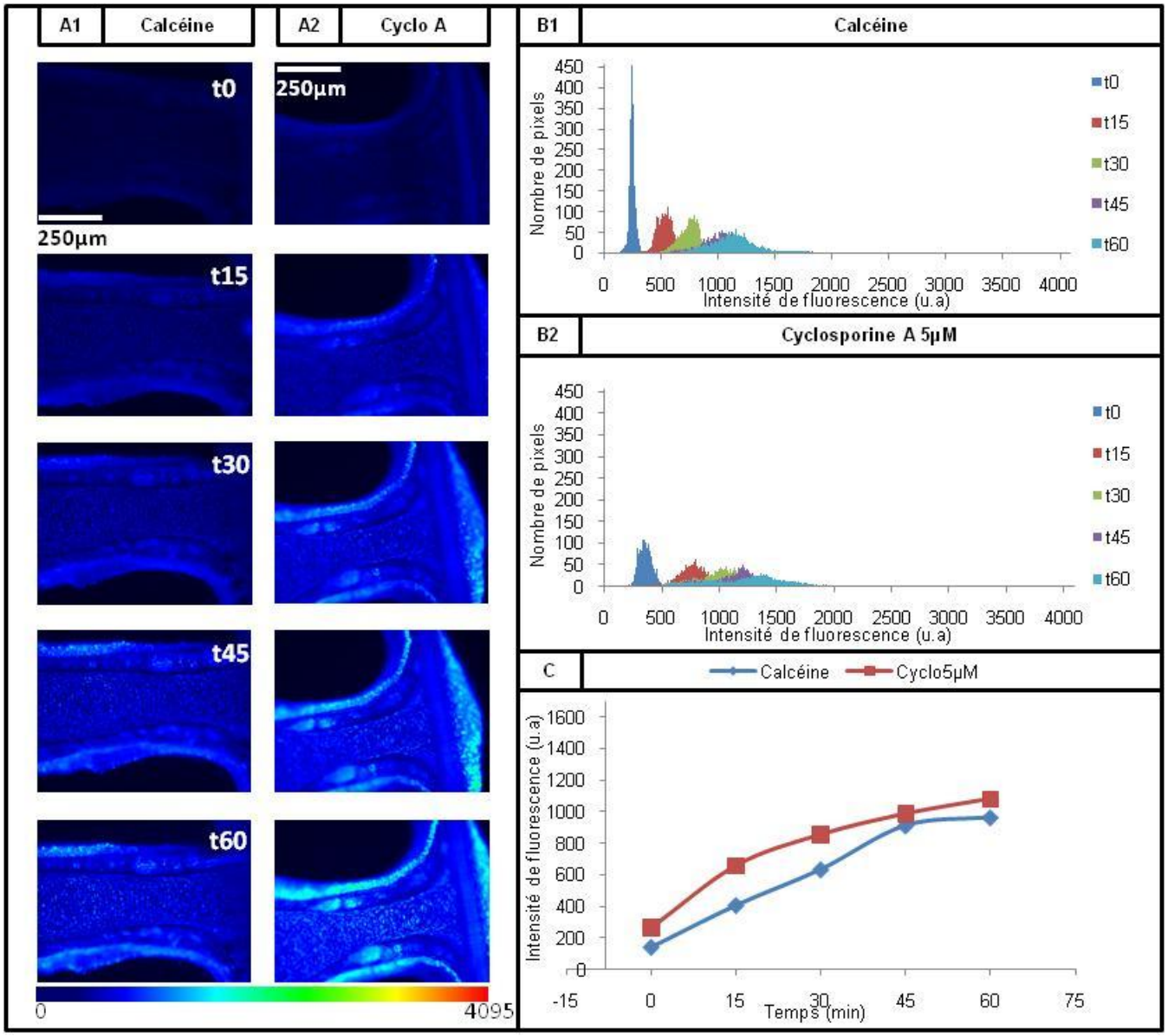


Figure 43 : Effet de la cyclosporine A 5 µM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de rat nouveau-né. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1] et en présence de calcéine AM 1 µM + cyclosporine A (Cyclo) 5 µM [A2]. Les deux tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes de préincubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1] et en présence de calcéine AM 1 µM + cyclosporine A 5 µM [B2]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

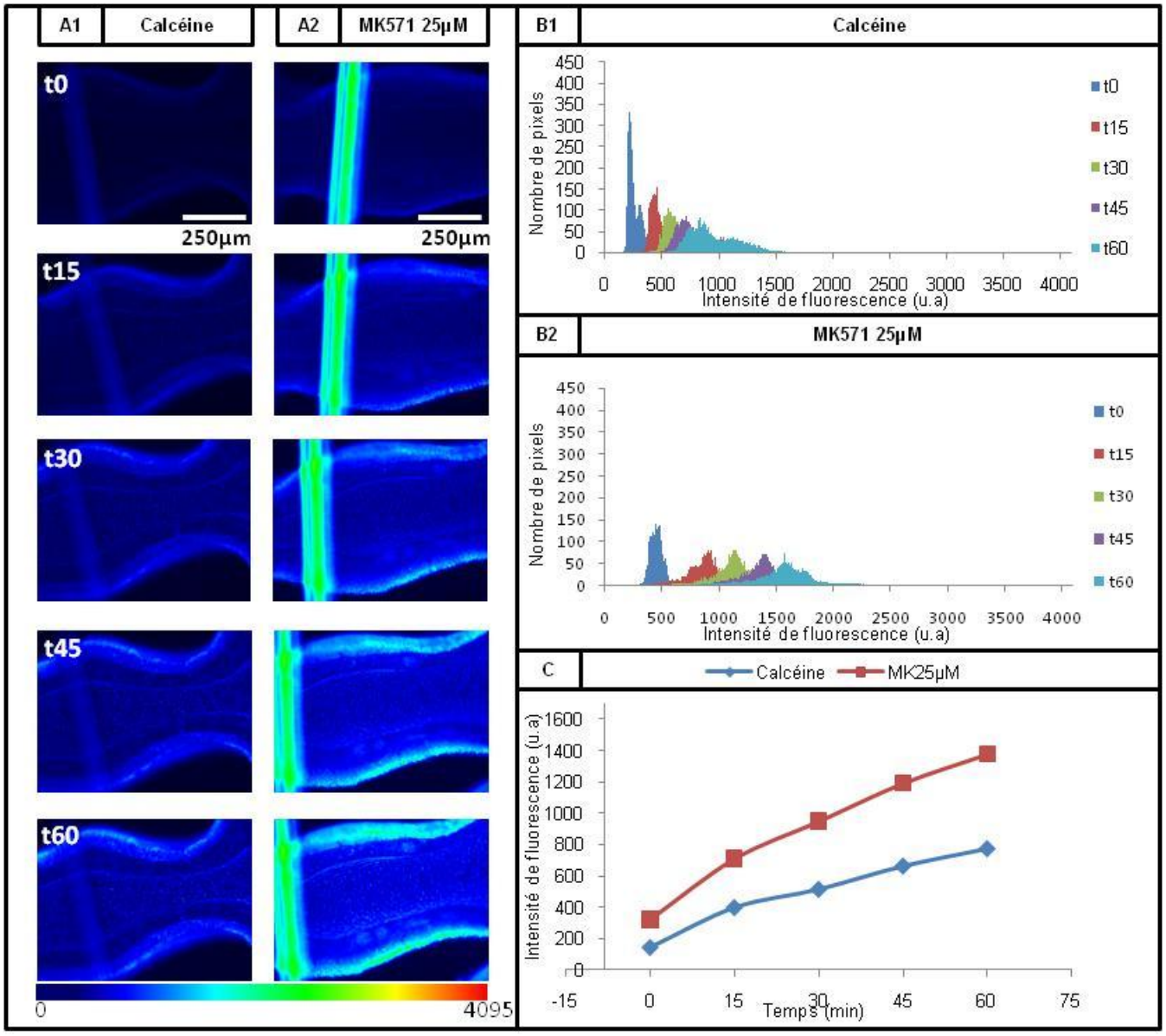


Figure 44 : Effet du MK571 25 µM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de rat nouveau-né. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1] et en présence de calcéine AM 1 µM + MK571 25 µM [A2]. Les deux tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes de préincubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1] et en présence de calcéine AM 1 µM + MK571 25 µM [B2]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

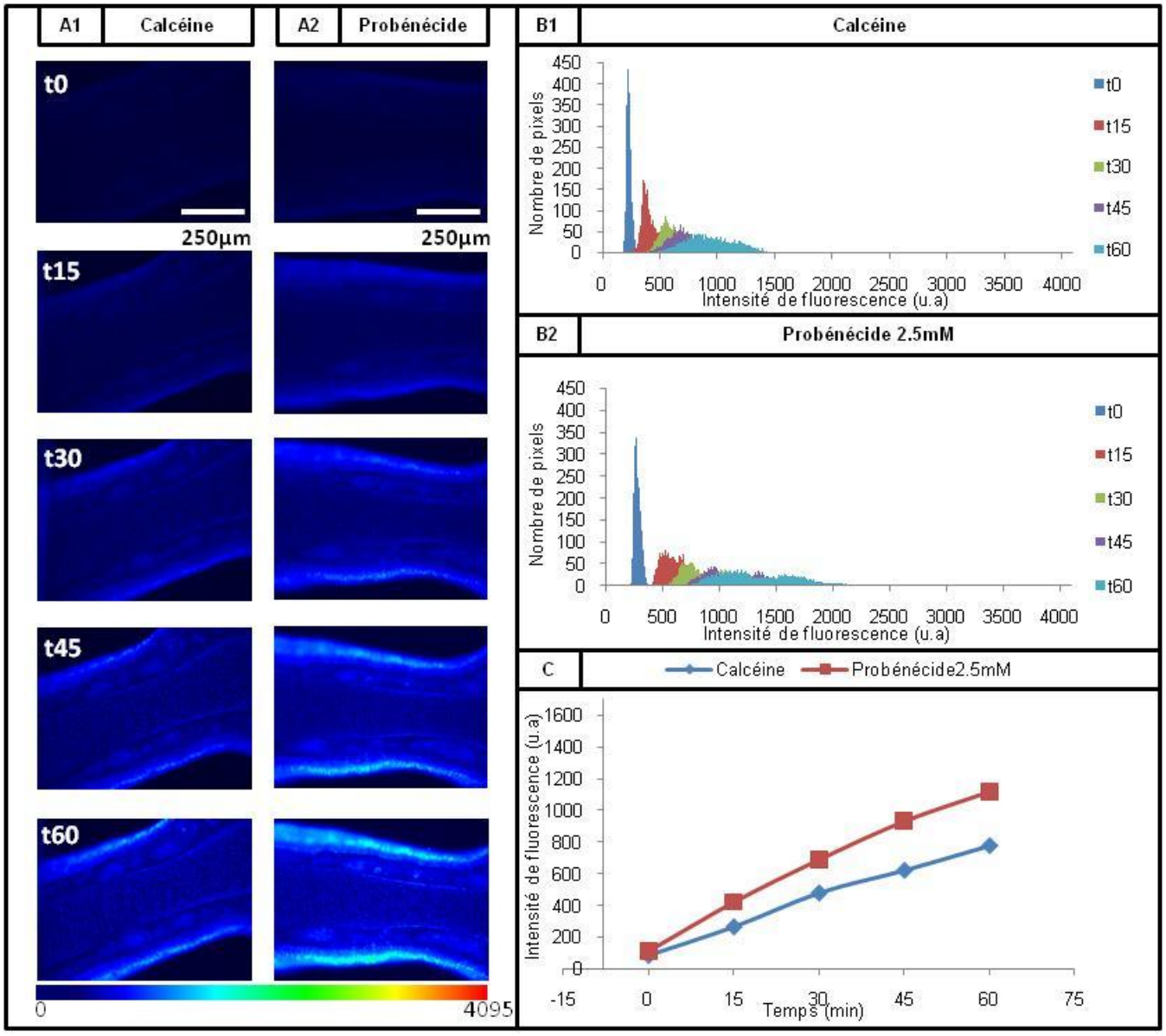


Figure 45 : Effet du probénécide 2.5mM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de rat nouveau-né. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1] et en présence de calcéine AM 1 µM + probénécide 2.5mM [A2]. Les deux tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes d'incubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1] et en présence de calcéine AM 1 µM + probénécide 2.5mM [B2]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

a) Récapitulatif

Avec les moyennes d'intensité de fluorescence obtenues à partir de plusieurs échantillons de t0 à t60 pour chaque condition on observe un effet dose dépendant des bloqueurs sur la cinétique d'incorporation de calcéine par la muqueuse olfactive (**Figure 50**). Ainsi, le MK571 25 µM augmente

la vitesse de la cinétique. Cet effet supérieur quand on augmente la concentration du MK571 à 50 µM. Le vérapamil 100 µM et la cyclosporine A 5 µM ne semblent pas, en moyenne, avoir d'effet sur la cinétique. En augmentant leur concentration, 200 µM pour le vérapamil et 10 µM pour la cyclosporine A on observe, en moyenne, une accélération de la cinétique par rapport au témoin. Le probénécide accélère la cinétique à une concentration de 2.5mM mais semble avoir un effet moindre lorsque l'on augmente sa concentration à 5mM. Lorsqu'un bloqueur a un effet sur la cinétique ce là peut amener à une accélération de la cinétique d'un facteur 1.2 pour le probénécide 2.5mM à presque 4.0 pour le MK571 50 µM (**Figure 51**).

Les effets les plus importants sur la cinétique de chargement de calcéine-AM par la muqueuse olfactive de rat nouveau sont observés avec MK571.Ces effets sont significatifs (**Tableau 16**), pour le MK571 à 25 µM, la vitesse de la cinétique est en moyenne, pour quatre échantillons, de 15.28 u.a/min soit en moyenne 2.5 fois plus rapide que les témoins respectifs (**Tableau 17**). Cet effet est concentration dépendant (**Figure 46**), à 50 µM la vitesse de la cinétique est en moyenne, pour quatre échantillons, de 19.48 u.a/min, soit en moyenne 3.9 fois plus rapide que les témoins respectifs.

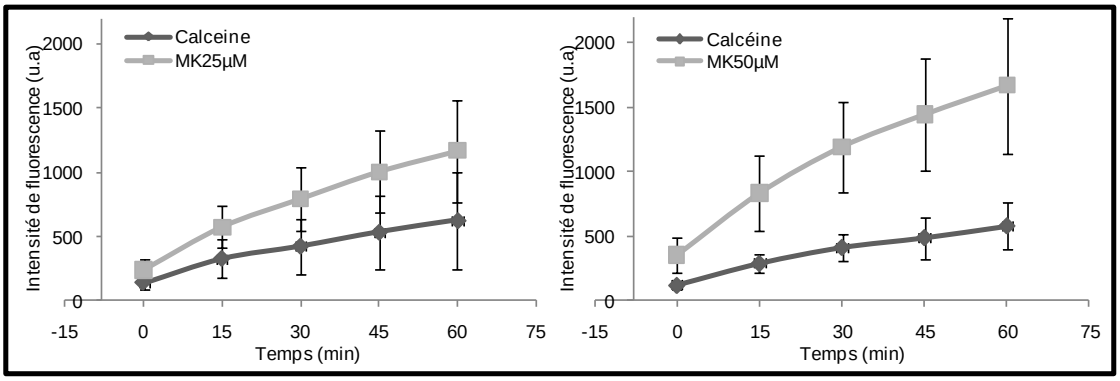


Figure 46 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 4 tranches coronales de la cavité nasale de rats nouveau-nés incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de MK571 25 µM, de MK571 50 µM et de leur condition contrôle respective avec uniquement calcéine-AM 1 µM. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

Les effets du probénécide ne sont significatifs qu'à une concentration de 2.5mM (**Tableau 16**). La vitesse de la cinétique moyenne, pour cinq échantillons, est de 16.08 u.a/min, soit en moyenne 2.3 fois celle des témoins respectifs (**Tableau 17**). Le fait d'augmenter la concentration de probénécide à 5mM réduit l'effet du bloqueur sur la vitesse de la cinétique (**Figure 47**). L'effet n'est alors plus significatif. La vitesse de la cinétique est en moyenne, pour cinq échantillons, de 12.65 u.a/min, soit une moyenne de 1.2 fois la vitesse des témoins respectifs.

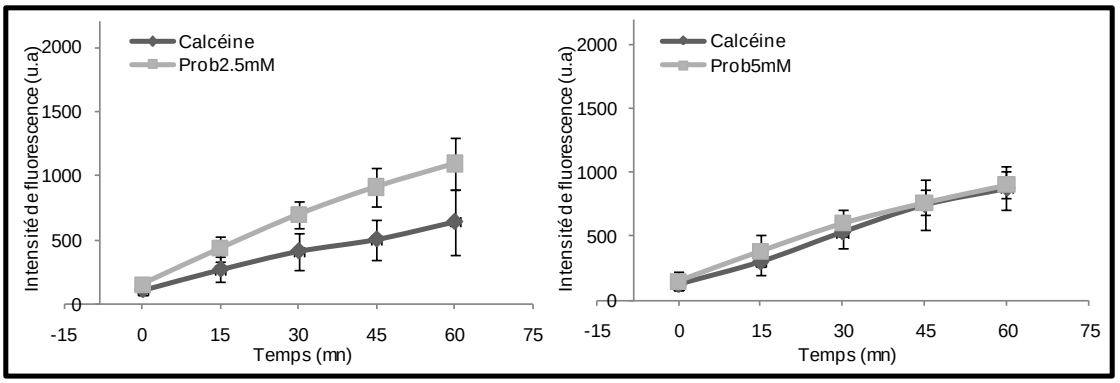


Figure 47 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 6 tranches coronales de la cavité nasale de rats nouveau-nés incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de probénécide (prob) 2.5mM, de probénécide 5mM et de leur condition contrôle respective avec uniquement calcéine-AM 1 µM. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

La cyclosporine A ne semble avoir un effet qu'à une concentration de 10 µM. Cet effet est significatif (**Tableau 16**). La vitesse de la cinétique est en moyenne, pour quatre échantillons, de 19.69 UA/min, soit une moyenne de 2.1 fois la vitesse des témoins respectifs (**Tableau 17**). A une concentration plus faible, soit 5 µM, la cyclosporine A ne semble pas avoir d'effet avec une cinétique moyenne pour trois échantillons quasiment identique à la moyenne de la cinétique des témoins (**Figure 48**).

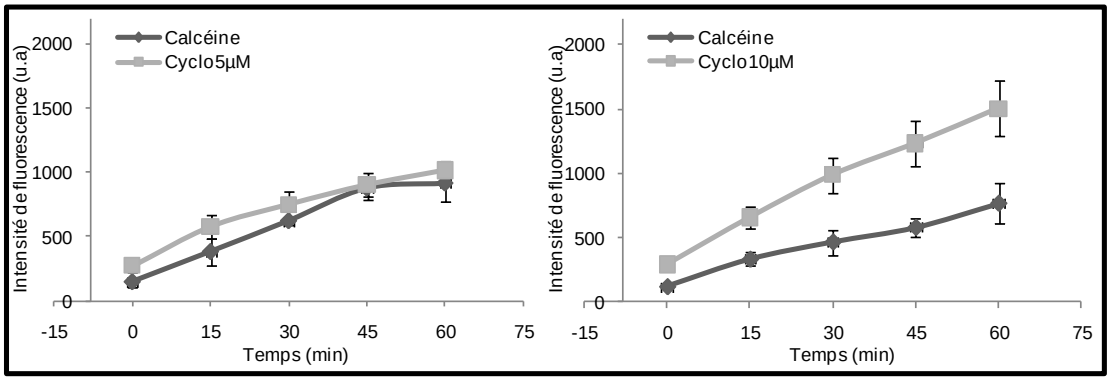


Figure 48 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 3 tranches coronales de la cavité nasale de rats nouveau-nés incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de cyclosporine A (Cyclo) 5 µM, de 4 tranches incubées avec calcéine-AM en présence de cyclosporine A 10 µM et de leur condition contrôle respective avec uniquement calcéine-AM 1 µM. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

Le vérapamil ne présente aucun effet significatif sur la cinétique de chargement de la calcéine (**Tableau 16**). Pourtant, à une concentration de 200 µM la vitesse moyenne de la cinétique pour trois échantillons est de 15u.a/min soit en moyenne 2.2 fois celle des témoins respectifs (**Tableau 17**). La tendance observée semble être dépendante de la concentration puisque le vérapamil à 100 µM présente en moyenne pour trois échantillons une cinétique très proche de celle du témoin respectif (**Figure 49**).

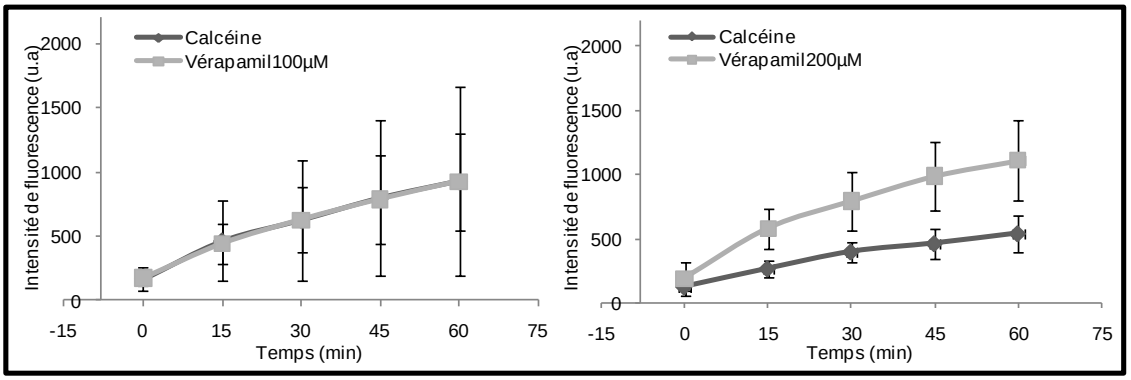


Figure 49 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les valeurs moyennes sont obtenues à partir de 3 tranches coronales de la cavité nasale de rats nouveau-nés incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de vérapamil 100 µM, de vérapamil 200 µM et de leur condition contrôle respective avec uniquement calcéine-AM 1 µM. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

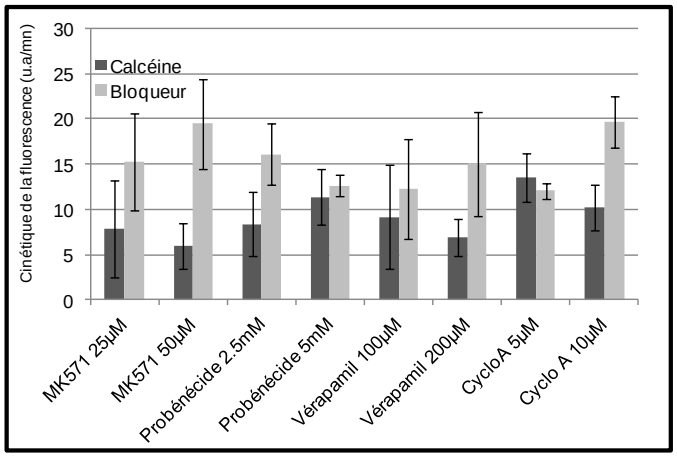


Figure 50 : Chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive en fonction du temps. Valeurs moyennes avec ou sans bloqueur obtenues sur les tranches coronales de la cavité nasale de rats nouveau-nés. Le chargement est exprimé en intensité de la fluorescence par minute. Les barres d'erreur représentent l'écart type. (Cyclo A=cyclosporine A)

Bloqueur	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec bloqueur	Variabilité relative (%)	p	n
MK571 25µM	7.85 (±5.38)	68.56	15.28 (±5.42)	35.49	0.0076	4
MK571 50µM	5.92 (±2.53)	42.73	19.48 (±5.01)	25.73	0.0226	4
Probénécide 2.5mM	8.37 (±3.59)	42.89	16.08 (±3.37)	20.96	0.0014	6
Probénécide 5mM	11.34 (±3.09)	27.24	12.65 (±1.20)	9.45	0.4420	6
Vérapamil 100µM	9.18 (±5.73)	62.35	12.27 (±5.49)	44.72	0.0938	3
Vérapamil 200µM	6.87 (±2.05)	29.90	15.03 (±5.71)	37.99	0.0775	3
Cyclosporine A 5µM	13.50 (±2.63)	19.51	12.03 (±0.90)	7.45	0.4194	3
Cyclosporine A 10µM	10.23 (±2.51)	24.59	19.69 (±2.78)	14.13	0.0324	4

Tableau 16 : Chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de rats nouveau-nés. Valeurs exprimées en intensité de la fluorescence par minute. Variabilité relative= (écart type/moyenne)*100. Statistique : Test de Student bilatéral par paires, avec seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$. n=effectif

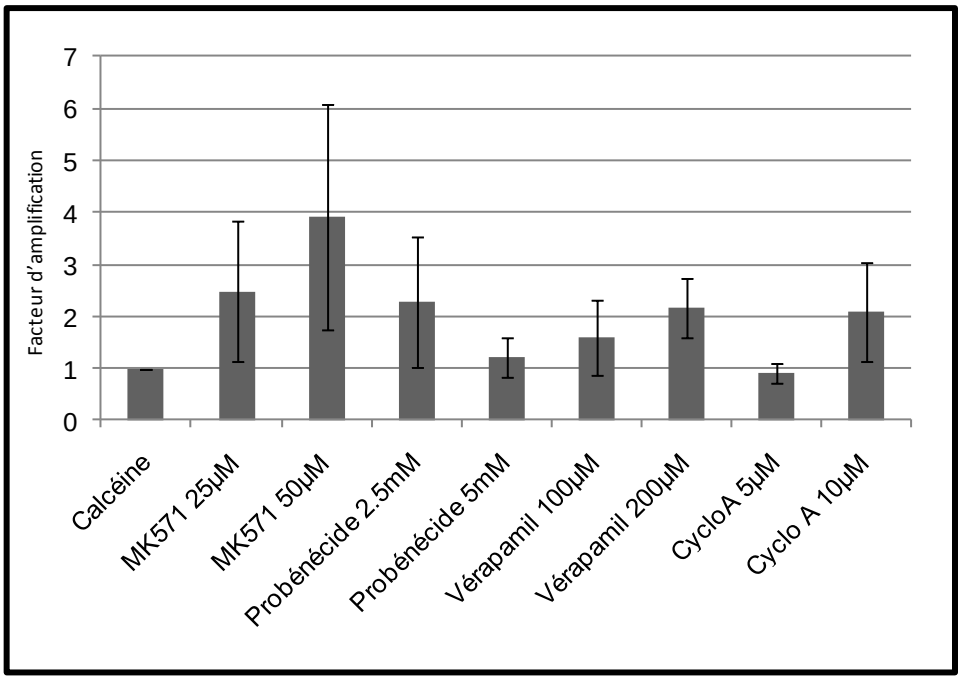


Figure 51 : Rapport moyen du chargement de la calcéine-AM en présence d'un bloqueur sur le chargement de la calcéine-AM dans la condition contrôle chez le rat nouveau-né. Les barres d'erreur représentent l'écart type. (Cyclo A=cyclosporine A)

Bloqueur	Moyenne	Variabilité relative (%)	Intervalle	Rapport max/min	n
Contrôle	1.00	-	-	-	19
MK571 25µM	2.48 (±1.36)	54.58	1.50-4.46	2.98	4
MK571 50µM	3.90 (±2.16)	55.51	1.86-6.62	3.56	4
Probénécide 2.5mM	2.29 (±1.39)	62.58	1.45-4.71	3.26	5
Probénécide 5mM	1.20 (±0.38)	32.08	0.80-1.63	2.03	5
Vérapamil 100µM	1.60 (±0.72)	45.17	1.11-2.43	2.20	3
Vérapamil 200µM	2.18 (±0.57)	26.18	1.60-2.74	1.71	3
Cyclosporine A 5µM	0.94 (±0.18)	19.25	0.74-1.09	1.48	3
Cyclosporine A 10µM	2.09 (±0.95)	45.27	1.51-3.51	2.33	4

Tableau 17 : Rapport moyen du chargement de la calcéine-AM en présence d'un bloqueur sur le chargement de la calcéine-AM dans la condition contrôle chez le rat nouveau-né. Variabilité relative= (écart type/moyenne)*100. n=effectif.

5. Effet de bloqueurs de MDR 1 et de MRP1 sur le chargement de la calcéine chez la souris transgénique FVB/Ntac Mrp1 ¯/¯ nouveau-née

La lignée de souris transgénique utilisée est une lignée dont le gène codant pour la MRP1 a été invalidé. Nous avons voulu observer les effets de l'absence de ce transporteur de xénobiotiques sur le chargement de la calcéine-AM par l'épithélium olfactif de souris nouveau-née.

a) Dans la condition contrôle

Dans la condition témoin on trouve une grande variabilité du chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris transgéniques (**Tableau 18**). Ainsi, après préincubation on a pu obtenir une fluorescence moyenne pouvant atteindre une valeur jusqu'à 7.8 fois supérieure entre deux échantillons avec une variabilité moyenne de 45.26 %. A t60, la valeur moyenne de l'intensité de fluorescence dans la muqueuse olfactive a pu être jusqu'à 4.8 fois différente entre deux individus avec une variabilité de 39.57 %. Tout comme chez la souris Balb/c de lignée sauvage et chez le rat wistar, l'évolution de l'intensité de la fluorescence au cours du temps est linéaire (**Figure 52**).La vitesse moyenne de la cinétique de chargement de la calcéine-AM dans ces conditions pour les onze échantillons est en moyenne de 12.43 u.a/min. Elle est légèrement supérieure à celle obtenue chez la souris Balb/c de lignée sauvage et chez le rat wistar avec des valeurs respectives de 9.26u.a/min et de 9.05u.a/min (**Tableau 19**).

	Intervalle	Rapport max/min	Moyenne	Variabilité relative (%)	n
T0	43.50-341.39	7.85	193.40 (±87.54)	45.26	11
T60	340.05-1633.07	4.80	986.36	39.57	11

Tableau 18 : Variabilité de l'intensité de la fluorescence mesurée à partir de la muqueuse de souris mutante après 8minutes d'incubation (t0) et 60minutes plus tard (t60). n=effectif.

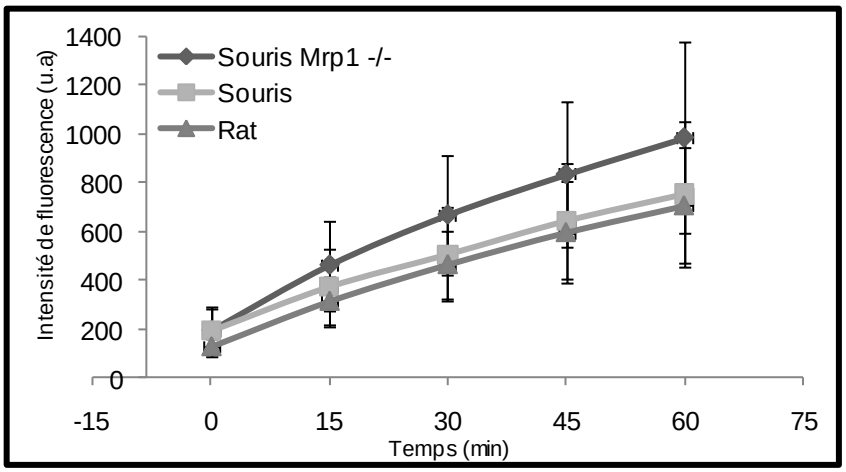


Figure 52 : Evolution de l'intensité moyenne de la fluorescence dans la muqueuse olfactive de souris mutante en fonction du temps. La fluorescence est mesurée en unité arbitraire sur une échelle de 4096 valeurs. Le temps est mesuré en minutes. Les valeurs sont des moyennes obtenues à partir de 11 échantillons. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

	Souris FVB/Ntac Mrp1 -/-	Souris Balb/c lignée sauvage	Rat Wistar
Cinétique (u.a/min)	12.43 (±4.82)	9.26 (±3.82)	9.05 (±3.82
Effectif	11	16	19

Tableau 19 : Comparaison de la cinétique moyenne d'incorporation de calcéine dans la muqueuse olfactive de rongeurs nouveau-nés. La cinétique représente l'évolution de l'intensité de fluorescence, en unité arbitraire, au cours du temps, en minutes.

6. Effet des Bloqueurs de MDR1 et de MRP1 chez la souris transgéniques FVB/Ntac Mrp1 ˉ/ˉ, nouveau-née.

Comme pour la souris de lignée sauvage et le rat nous avons voulu étudier l'activité de transport des xénobiotiques en utilisant des bloqueurs spécifique de MDR1, vérapamil et cyclosporine A, et des bloqueurs spécifiques de MRP1, MK571 et probénécide. Ces animaux étant onéreux, nous nous

somme contenté d'une seule concentration pour chaque bloqueur pour minimiser le nombre d'échantillons.

Dans la condition témoin la forme de la distribution de la fluorescence est semblable à celle déjà observée chez la souris Balb/c et chez le rat. La présence de bloqueur de MDR1, vérapamil et cyclosporine A et de bloqueur de MRP1, MK571 et probénécide, ne modifie pas cette localisation. Chez la souris transgénique le vérapamil 200 µM, la cyclosporine A 5 µM, et le probénécide 2.5mM n'ont pas d'effet visible sur le chargement de calcéine par la muqueuse olfactive de nouveau-né contrairement au MK571 25 µM (**Figure 53**A, **Figure 54**A). Cet effet est comparable à celui observé chez la souris Balb/c de lignée sauvage et chez le rat. La plus forte intensité de la fluorescence se fait remarquer dès les huit premières minutes de préincubation.

Le profil des histogrammes d'intensité obtenus à partir du tri des pixels inclus dans chaque ROI sont semblables entre la condition témoin et en présence de vérapamil 200 µM, de cyclosporine A 5 µM, et de probénécide 2.5mM (**Figure 53**B, **Figure 54**B). L'ensemble des pixels voit son intensité de fluorescence augmenter linéairement au cours du temps. Après 60minutes leur intensité est comprise dans un intervalle relativement restreint. En présence de MK571 25 µM comme pour les lignées sauvages, l'intensité de fluorescence évolue de façon hétérogène, ce qui aboutit à un profil des histogrammes qui s'étend sur une large gamme de valeurs jusqu'à saturation de notre échelle.

De la même manière, l'évolution de l'intensité de fluorescence au cours du temps en présence de vérapamil 200 µM, de cyclosporine A 5 µM, et de probénécide 2.5mM (**Figure 53**C, **Figure 54**C) est similaire à la condition témoin pour les exemples présentés. Elle est affectée uniquement en présence de MK571 25 µM avec une valeur de 32u.a/min contre 7.5u.a/min pour le témoin.

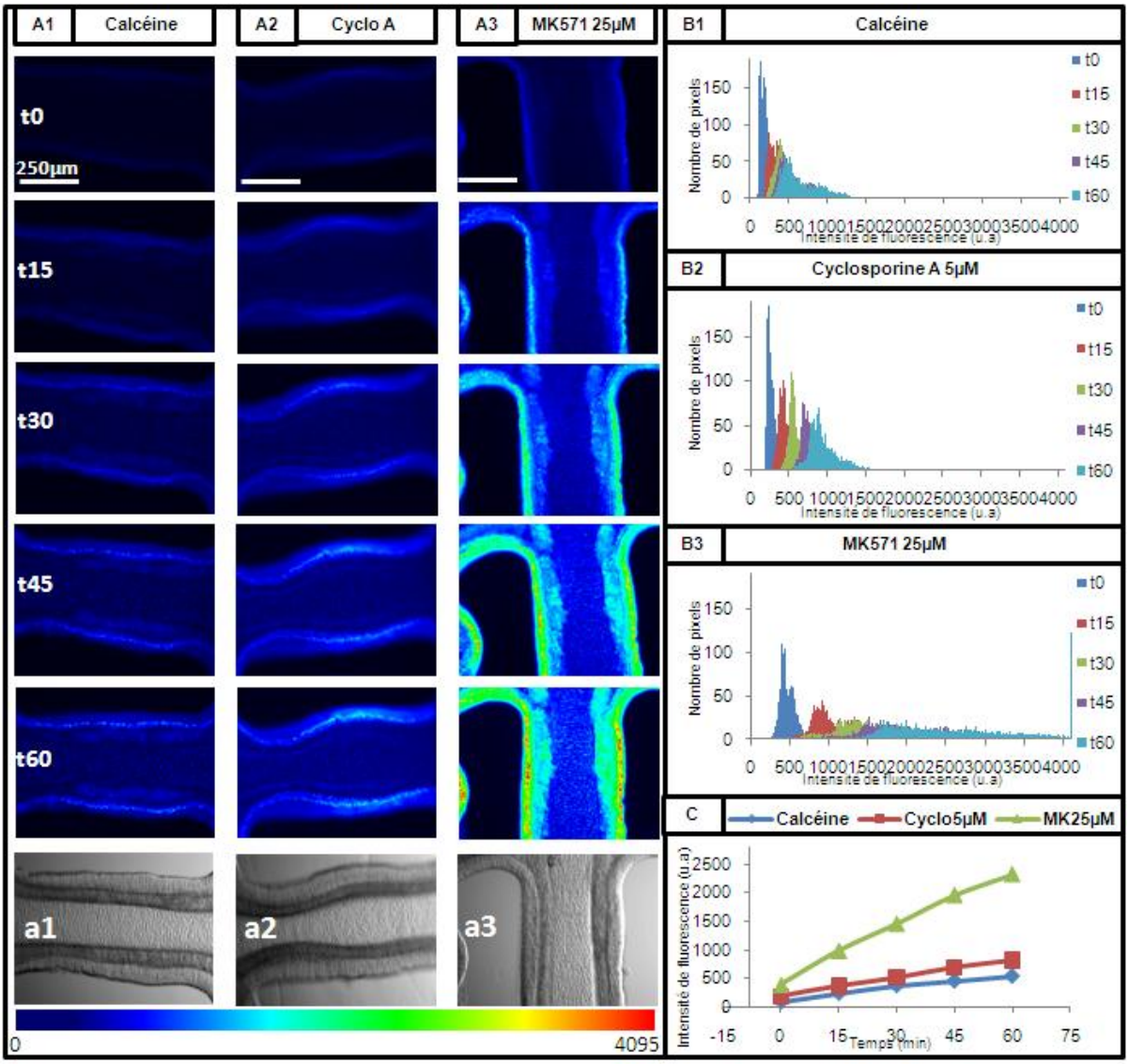


Figure 53 : Effet de la cyclosporine A 5 µM et du MK571 25 µM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris transgénique nouveau-née. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1], en présence de calcéine AM 1 µM + cyclosporine A (Cyclo A) 5 µM [A2] et en présence de calcéine AM 1 µM + MK571 25 µM [A3]. [a1, a2, a3] Images des tranches prises en transmission. Les trois tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes de préincubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1], en présence de calcéine AM 1 µM + cyclosporine A 5 µM [B2] et en présence de calcéine AM 1 µM + MK571 25 µM [B3]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

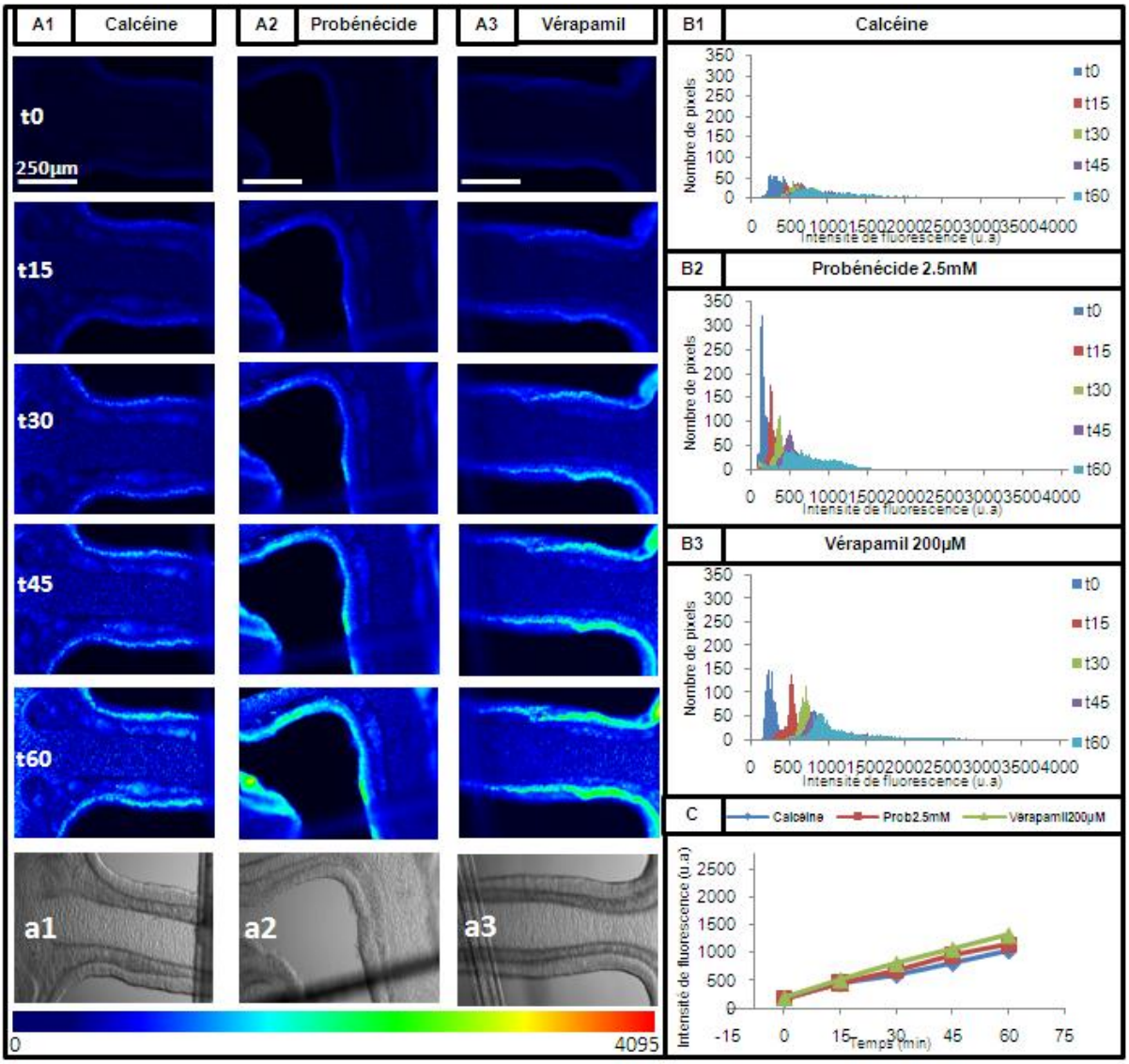


Figure 54 : Effet du probénécide 2.5mM et du vérapamil 200 µM sur le chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris transgénique nouveau-née. [A] Tranches coronales de la cavité nasale de souris incubées en présence de calcéine-AM 1 µM [A1], en présence de calcéine AM 1 µM + probénécide 2.5mM [A2] et en présence de calcéine AM 1 µM + vérapamil 200 µM [A3]. [a1, a2, a3] Images des tranches prises en transmission. Les trois tranches proviennent du même animal. La première image est prise après 8 minutes de préincubation. Les autres sont prises avec 15 minutes d'intervalle. [B] Histogrammes de distribution des pixels de la région d'intérêt en fonction de l'intensité de leur fluorescence en présence de calcéine-AM 1 µM [B1], en présence de calcéine-AM 1 µM + probénécide (prob) 2.5mM [A2] et en présence de calcéine-AM 1 µM + vérapamil 200 µM [B3]. [C] Intensité moyenne de la fluorescence dans la région d'intérêt en fonction du temps.

a) Récapitulatif

L'analyse des cinétiques moyennes obtenues à partir de 6 échantillons avec MK571, 4 échantillons avec probénécide, 5 échantillons avec vérapamil et 5 échantillons avec cyclosporine A montre que seul

le MK571 a un effet sur la cinétique d'incorporation de calcéine.(**Figure 59**, **Tableau 20**). Là où la vitesse de la cinétique est multipliée en moyenne par 3.3 en présence de MK571, elle reste pratiquement inchangée en présence des autres bloqueurs (**Figure 60**, **Tableau 21**)

L'intensité de la fluorescence en présence de MK571 est supérieure à celle du témoin après préincubation. L'écart est flagrant après 60 minutes d'incubation supplémentaires (**Figure 55**). Cet effet du MK571 sur l'évolution de l'intensité de fluorescence au cours du temps est significatif (**Tableau 20**).

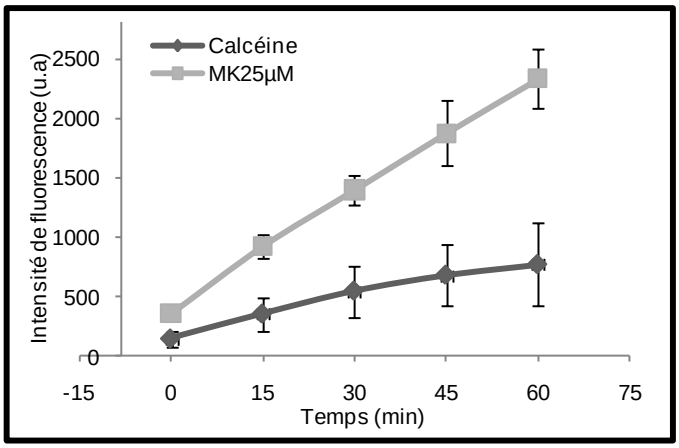


Figure 55 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 6 tranches coronales de la cavité nasale de souris transgéniques nouveau-nées incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de MK571 25 µM et de leur condition contrôle respective avec uniquement calcéine-AM 1 µM. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

En présence de probénécide 2.5mM (**Figure 56**), de vérapamil 200 µM (**Figure 57**) et de cyclosporine A 5 µM (**Figure 58**), en moyenne, l'intensité de la fluorescence reste comparable à celle du témoin et ce juste après préincubation tout comme après 60 minutes supplémentaires. La cinétique moyenne en présence de chaque bloqueur est quasiment identique à celle de leur témoin respectif.

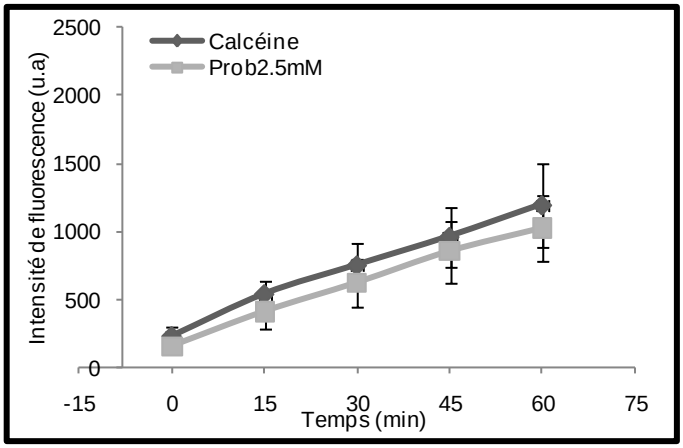


Figure 56 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les valeurs moyennes sont obtenues à partir de 4 tranches coronales de la cavité nasale de souris transgéniques nouveau-nées incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de probénécide (prob) 2.5mM et de leur condition contrôle respective où les tranches sont incubées avec la calcéine-AM 1 µM uniquement. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

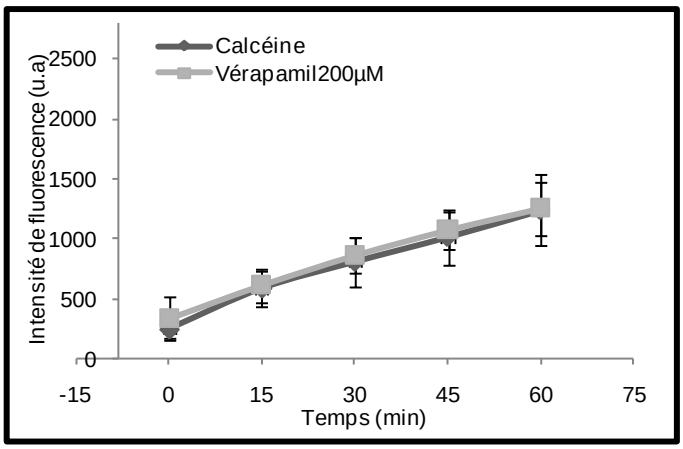


Figure 57 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 5 tranches coronales de la cavité nasale de souris transgéniques nouveau-nées incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de vérapamil 200 µM et de leur condition contrôle respective où les tranches sont incubées avec la calcéine-AM 1 µM uniquement. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

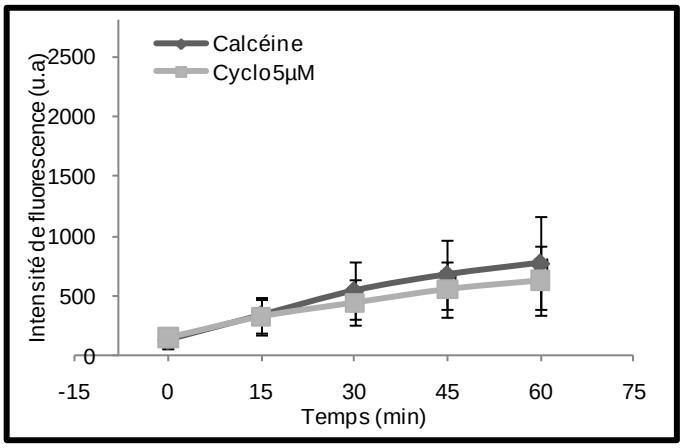


Figure 58 : Intensités moyennes de la fluorescence en fonction du temps. Les Valeurs moyennes sont obtenues à partir de 5 tranches coronales de la cavité nasale de souris transgéniques nouveau-nées incubées avec la calcéine-AM 1 µM en présence de cyclosporine A (cyclo) 5 µM et de leur condition contrôle respective où les tranches sont incubées avec la calcéine-AM 1 µM uniquement. L'intensité de la fluorescence est mesurée en unités arbitraires sur une échelle de 0 à 4095. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

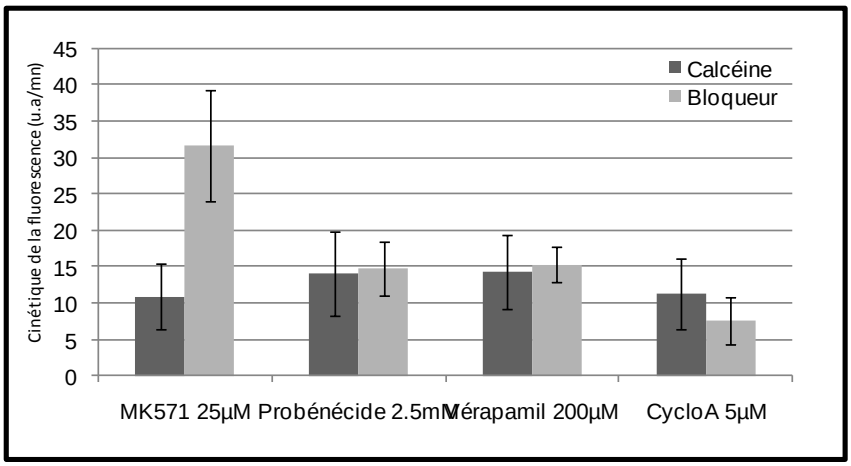


Figure 59 : Chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive en fonction du temps. Valeurs moyennes avec ou sans bloqueur obtenues sur les tranches coronales de la cavité nasale de souris mutantes nouveau-nées. Le chargement est exprimé en intensité de la fluorescence par minute. Les barres d'erreur représentent l'écart type. (Cyclo A=cyclosporine A)

Bloqueur	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec bloqueur	Variabilité relative (%)	p	n
MK571 25µM	10.90 (±4.46)	40.94	31.64 (±7.57)	23.93	0.0012	6
Probénécide 2.5mM	14.09 (±5.81)	41.23	14.78 (±3.65)	24.71	0.8078	4
Vérapamil 200µM	14.26 (±5.05)	35.38	15.31 (±2.37)	15.45	0.6819	5
Cyclosporine A 5µM	11.24 (±4.90)	43.56	7.58 (±3.25)	42.87	0.1757	5

Tableau 20 : Chargement de la calcéine-AM par la muqueuse olfactive de souris mutantes nouveau-nées. Valeurs exprimées en intensité de la fluorescence par minute. Variabilité relative= (écart type/moyenne)*100. Statistique : Test de Student bilatéral par paires, avec seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$. n=effectif.

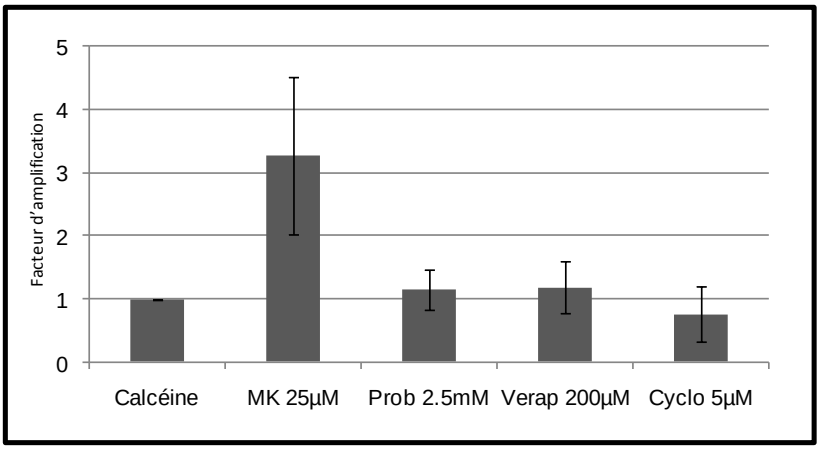


Figure 60 : Rapport moyen du chargement de la calcéine-AM en présence d'un bloqueur sur le chargement de la calcéine-AM dans la condition contrôle chez la souris mutante nouveau-née. Les barres d'erreur représentent l'écart type. (Verap=vérapamil, Prob=probénécide, Cyclo= cyclosporine A)

Bloqueur	Moyenne	Variabilité relative (%)	Intervalle	Rapport max/min	n
Contrôle	1.00	-	-	-	11
MK571 25µM	3.26 (±1.25)	38.21	1.98-4.76	2.41	6
Probénécide 2.5mM	1.14 (±0.32)	27.99	0.67-1.36	2.03	4
Vérapamil 200µM	1.19 (±0.41)	34.44	0.65-1.70	2.62	5
Cyclosporine A 5µM	0.76 (±0.45)	58.86	0.44-1.53	3.47	5

Tableau 21 : Rapport moyen du chargement de la calcéine-AM en présence d'un bloqueur sur le chargement de la calcéine-AM dans la condition contrôle chez la souris mutante nouveau-née. Variabilité relative= (écart type/moyenne)*100. n=effectif.

B. Electro olfactogrammes

1. Préambule

Enregistrer un électro-olfactogramme, la réponse électrique de la muqueuse olfactive à la stimulation odorante, consiste à recueillir à l'aide d'une électrode dont la pointe est au contact de la surface de la muqueuse olfactive, le potentiel de champ correspondant principalement aux potentiels générateurs d'un échantillon large de neurones olfactifs. Ici, l'enregistrement se fait à la surface de l'épithélium dans une phase liquide submergeant la muqueuse olfactive.

Lorsque la préparation et le système d'enregistrement sont fonctionnels et en dehors de toute stimulation, l'électrode recueille à la surface de la muqueuse olfactive un signal constant au cours du temps. Il est toutefois sporadiquement animé de pics de fréquence aléatoire de très faibles amplitudes qui constituent un bruit de fond. Ce signal représente la ligne de base de l'enregistrement et les instruments de mesure sont réglés de façon à lui faire correspondre 0 mV. Lors d'une séquence d'enregistrement, un créneau de potentiel de 1 mV est appliqué en parallèle de la préparation au niveau de la terre. Le signal recueilli permettra de calibrer l'ensemble de la trace lors du traitement des données. Lorsque la valve permettant d'appliquer la stimulation est ouverte, un bref artéfact de faible amplitude est généralement enregistré (Figure **61**). A partir de ce moment, après un délai d'environ 1s, on voit apparaître une réponse due à la stimulation chimique. Lorsque la réponse obtenue est une dépolarisation, celle-ci est représentée par convention comme une déflexion négative. La période entre le début de la dépolarisation et l'amplitude maximale de la déflexion constitue une phase ascendante. La période de repolarisation et le retour à l'état de repos correspond à la phase descendante de la réponse. Pour l'étude qui suit, nous avons relevé uniquement l'amplitude maximale en mV (Vmax = valeur maximale de la déflexion, c'est à dire prise au niveau de la tangente horizontale au sommet de la déflexion) et superposé les traces afin de comparer leurs cinétiques, en particulier la durée de la phase ascendante, comprise entre le début de la dépolarisation et Vmax.

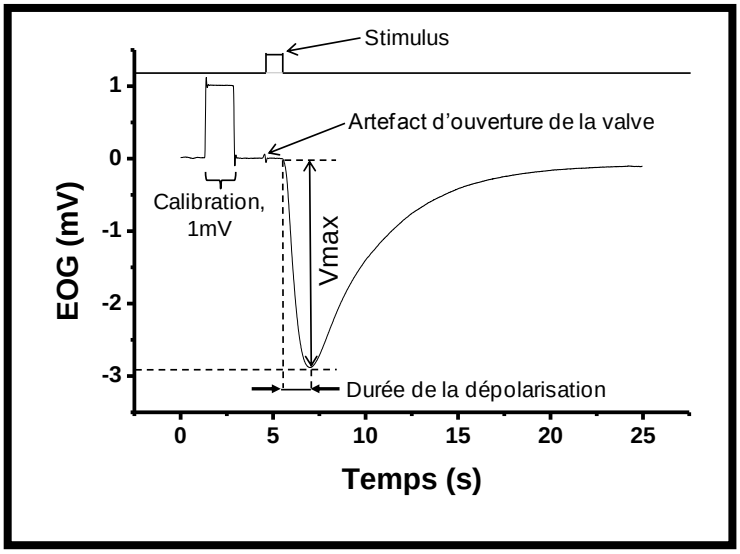


Figure **61 : Trace d'EOG typique obtenue lors de l'application d'un mélange de 8 odorants à une concentration de 10^{-4}M sur le septum intact d'un rat adulte.** L'application d'un stimulus odorant provoque une dépolarisation suivie d'une repolarisation à la surface de la muqueuse olfactive. Le stimulus carré de calibration de 1 mV est appliqué en parallèle de la préparation. L'ouverture de la valve provoque un artefact. La stimulation provoque une réponse avec un délai moyen de 0.8s. Vmax= amplitude maximale de la dépolarisation. L'amplitude et la durée de la dépolarisation dépendent de la préparation et des paramètres de la stimulation.

a) Electro-olfactogrammes en réponse à diverses stimulations

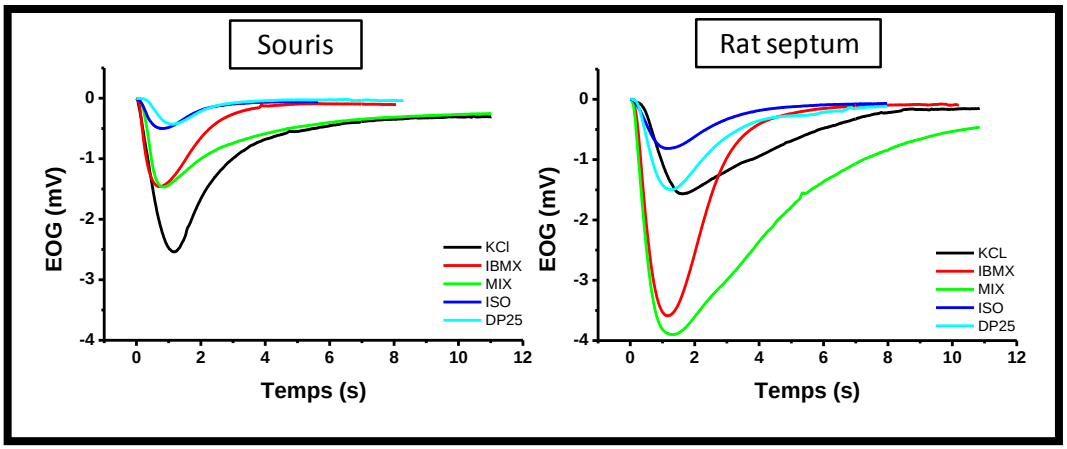


Figure 62 : Traces d'EOG obtenues dans la condition standard, regroupées en un seul graphique respectivement pour le septum de souris et de rat. Concentration des stimuli: 10^{-4}M. MIX : mélange de 8 odorants. ISO : acétate d'isoamyle. DP25 : 2,5-diméthyle pyrazine.

Tous les odorants, purs ou mélangés, cités précédemment dans le chapitre "Matériels et méthodes" appliqués sur de la muqueuse olfactive de rats et de souris en condition standard provoquent une dépolarisation (**Figure 63**).

Les stimulations les plus efficaces pour la région du septum enregistré sont, dans l'ordre décroissant, le mélange d'odorants, le 2-heptanone, l'acétophénone, le benzaldéhyde, l'octanal, l'octanol, l'acide octanoïque, l'acétate d'isoamyle, la 2,5-diméthyle pyrazine et le cinéole. Pour une même substance odorante, l'amplitude de la réponse est toujours supérieure avec une concentration de 10^{-4}M qu'avec une concentration de 10^{-5}M; la réponse est donc dépendante de la concentration. Par ailleurs, l'amplitude des réponses obtenues, à des points d'enregistrement analogues à partir de la même stimulation sont plus grandes chez le rat que chez la souris (**Figure 64**). Par exemple, sur le septum de rat, la stimulation avec le mélange provoque une réponse d'une amplitude de 2,27 mV à 10^{-5}M et 3,98 mV à 10^{-4}M contre respectivement 0,64 mV et 1,34 mV chez la souris.

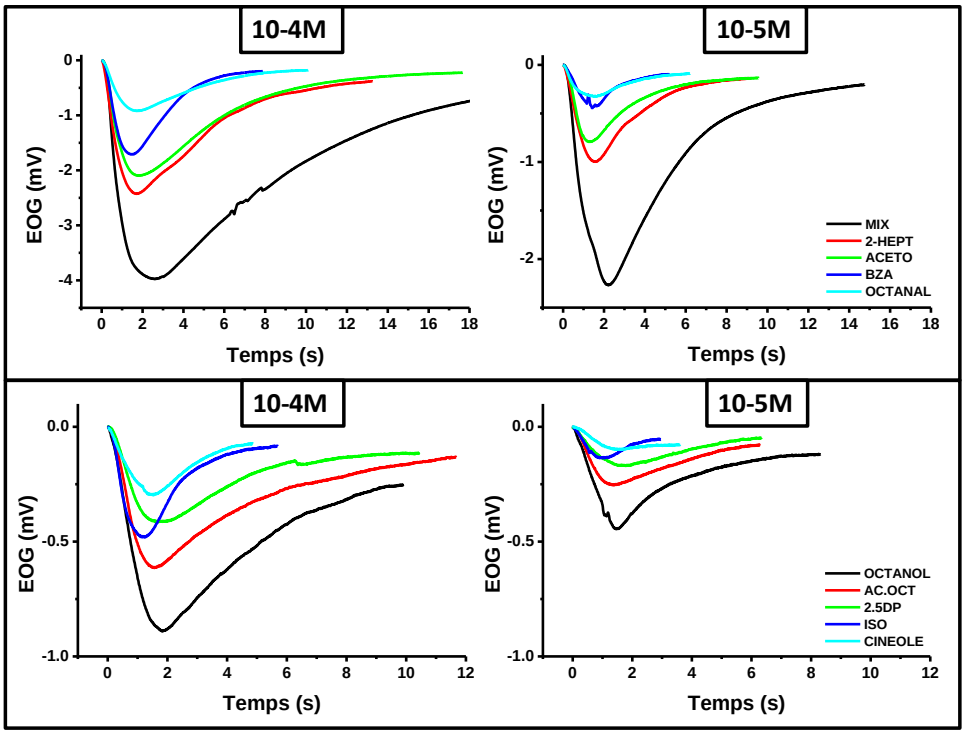


Figure 63 : Traces d'EOG enregistrées sur une muqueuse olfactive intacte de rat adulte lors de l'application de 9 odorants purs et d'un mélanges de ces odorants à l'exception du 2,5-diméthyle pyrazine. Dans la partie supérieure de la figure sont représentées les stimulations odorantes présentant la plus grande amplitude de réponse, c'est-à-dire le mélange de 8 odorants, le 2-heptanone, l'acétophénone, le benzaldéhyde et l'octanal à 10^{-5}M et 10^{-4}M. Dans la partie inférieure sont représentées les réponses à l'octanol, à l'acide octanoïque, à la 2,5-diméthyl pyrazine, à l'acétate d'isoamyle et au cinéole à 10^{-5}M et 10^{-4}M.

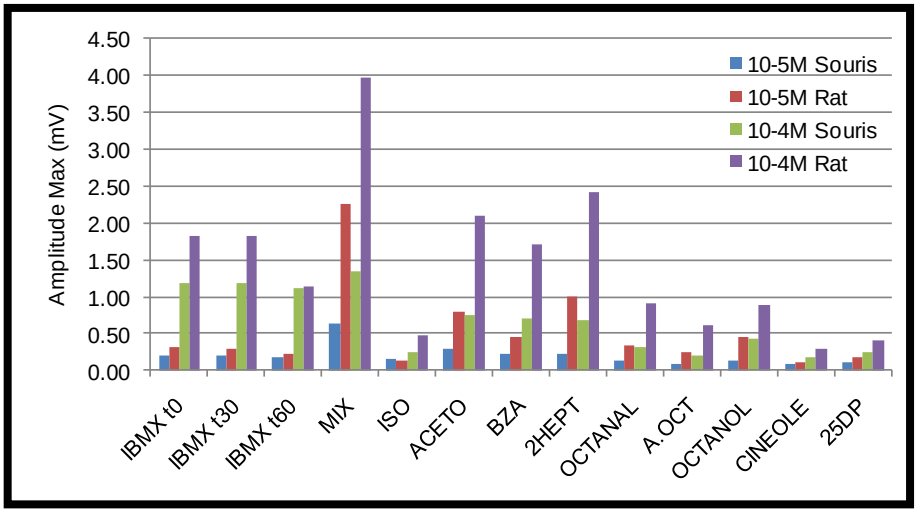


Figure 64 : Amplitudes maximales mesurées lors de stimulations à une concentration de 10^{-5}M et 10^{-4}M d'IBMX, d'odorants purs et d'un mélange (MIX) d'odorants sur le septum de souris et de rat. (ISO=acétate d'isoamyle, ACETO=acétophénone, BZA=benzaldéhyde, 2HEPT=2-heptanone, A.OCT=acide octanoïque, 25DP=2,5-diméthyl pyrazine)

La stimulation avec IBMX provoque une réponse semblable à celle obtenue avec des substances odorantes. L'amplitude maximale observée avec IBMX est comprise entre celle du mélange et l'acétophénone chez le rat, et juste après le mélange chez la souris pour la région du septum enregistrée. L'IBMX provoque une réponse de type olfactif de façon non spécifique. Ainsi la réponse obtenue lors de l'application d'IBMX doit recruter tous les neurones olfactifs sans distinction, ce qui nous donne une information sur l'état global d'excitabilité des neurones olfactifs présents dans le champ de l'électrode d'enregistrement. Les applications d'IBMX 10^{-4}M sur le septum de souris avec 30min d'intervalles montrent une réponse stable dans le temps avec une perte dans l'exemple présenté de seulement 70µV (<6 %) au bout d'une heure (**Figure 65**). Ces applications d'IBMX ont été intercalées au cours d'une série de stimulations avec le mélange et les corps purs avec 2min de récupération à chaque fois. Le fait que la réponse à l'IBMX reste stable au cours du temps et ce malgré une sollicitation soutenue de l'organe récepteur nous assure que la préparation est dans un bon état fonctionnel sur l'ensemble de la durée de notre protocole d'enregistrement.

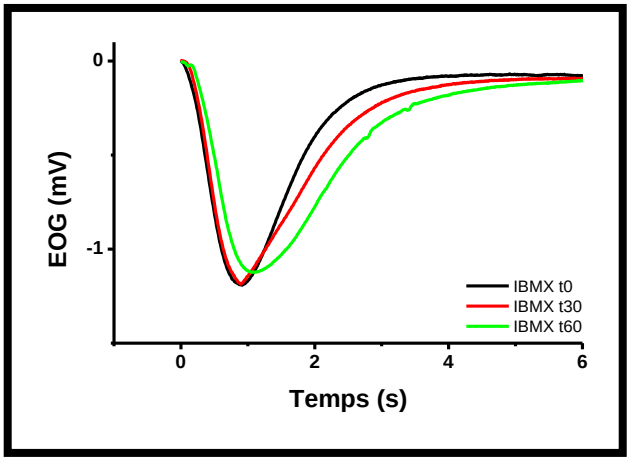


Figure 65 : Traces d'EOG obtenues en réponse à des stimulations séparées de 30 minutes de la muqueuse olfactive de souris avec de l'IBMX à 10^{-4}M. Au bout d'une heure l'amplitude de la réponse est réduite de 70µV (<6 %).

La cinétique de la phase ascendante est quasiment identique pour tous les odorants et l'IBMX tandis que la phase descendante présente trois profiles distincts (**Figure 66**). Un profil de repolarisation rapide, il est composé de l'IBMX, de l'acétate d'isoamyle, du benzaldéhyde et du cinéole. Un profil plus lent comprenant l'acide octanoïque, l'acétophénone, le 2-heptanone, l'octanol, l'octanal et le 2-5 diméthyle pyrazine. Le mélange présente un troisième profil avec une récupération très lente.

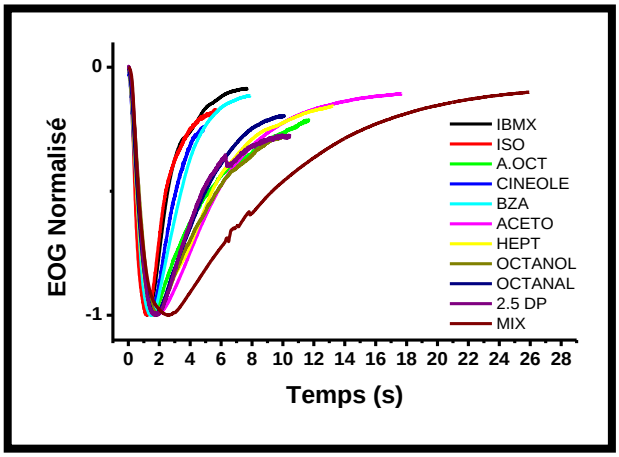


Figure 66 : Les traces d'EOG obtenues sur le septum de rat adulte par la stimulation avec des odorants purs et un mélange à une concentration de 10^{-4}M ont été normalisées par rapport à leur amplitude maximale respective et reportées sur le même graphique.

L'application de Ringer par la voie de stimulation ne provoque aucune réponse. Tandis qu'une réponse dépendant de la concentration est obtenue lors de l'application de DMSO. Les solutions mères 1M des substances odorantes et à 0,1M pour l'IBMX sont obtenues par dilution avec du DMSO. Les

solutions de travail sont obtenues par dilution avec du Ringer. Au maximum on retrouve 0,1 % de DMSO dans la solution de travail d'IBMX 10^{-4}M et 0,01 % à 10^{-5}M. Dans les solutions de travail des substances odorantes on retrouve moins de 0.01 % de DMSO à 10^{-4}M.

Sur un septum de rat nous avons appliqué trois fois de l'acétate d'isoamyle à 10^{-4}M. L'amplitude moyenne obtenue est de 1,5 mV. Dans cette solution d'acétate d'isoamyle il y a du DMSO à 0,0085 %. Nous avons donc appliqué sur la muqueuse olfactive une solution de DMSO 0,01 % dilué dans du Ringer. Le DMSO 0,01 % provoque une dépolarisation de 67µV, soit 4,5 % de l'amplitude de la réponse à l'acétate d'isoamyle 10^{-4}M (**Figure 67**).

Nous avons également appliqué de l'IBMX 10-4M. De toutes les substances de stimulation utilisées, l'IBMX 10^{-4}M contient le plus de DMSO, avec une concentration de 0,1 %. L'IBMX 10^{-4}M provoque une réponse d'amplitude moyenne de 3,72 mV, tandis que le DMSO 0,1 % provoque une réponse d'amplitude moyenne de 200µV, ce qui représente 13,8 % de l'amplitude de la réponse à l'IBMX 10^{-4}M.

Si on applique du DMSO 1 % sur le septum de rat l'amplitude moyenne de la réponse est de 931µV. Le DMSO a donc un effet concentration dépendant sur la muqueuse olfactive. Aux concentrations d'usage, les effets dus au DMSO sont faibles pour l'IBMX et négligeables pour les odorants. La stimulation avec du Ringer ne provoque pas de réponses. L'amplitude des réponses a été traitée telle qu'obtenue, le bruit et la part du DMSO n'ont pas été retirés.

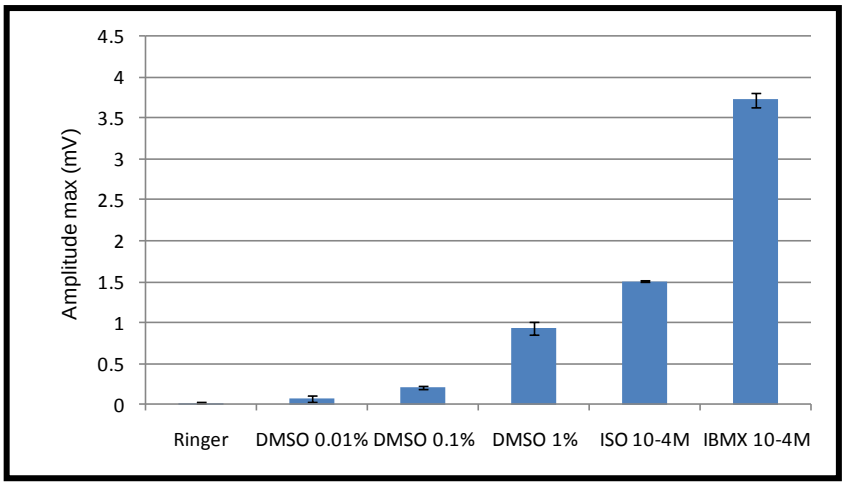


Figure 67 : Moyennes de l'amplitude maximale de dépolarisation mesurée à partir de traces d'EOG obtenues lors de la stimulation répétée trois fois du septum de rat avec du Ringer, du DMSO dilué à 0,01 %, 0,1 % et 1 %, de l'acétate d'isoamyle et de l'IBMX à 10^{-4}M.

b) *Variations des Electro olfactogrammes en condition standard*

Dans la condition standard on observe pour la même stimulation des variations de l'amplitude maximale entre chaque individu.

Sur le septum du rat, les variations sont au minimum d'un ordre de 2,14 fois pour le mélange à 10^{-4}M avec une variabilité de 29 % en moyenne. Elles sont au maximum de 4,46 fois pour l'acétate d'isoamyle à 10^{-4}M avec une variabilité de 44,14 % en moyenne (**Tableau 22**).

Sur le cornet du rat, les variations sont au minimum d'un ordre de 2,31 fois pour le mélange à 10^{-4}M avec une variabilité de 26,91 % en moyenne. Elles sont au maximum de 5,20 fois pour le KCl à 140mM avec une variabilité de 51,57 % en moyenne (**Tableau 23**).

Sur le septum de la souris, les variations sont au minimum d'un ordre de 3,4 fois pour le mélange à 10^{-4}M avec une variabilité de 30,21 % en moyenne. Elles sont au maximum de 12,1 fois pour l'IBMX 10^{-5}M avec une variabilité de 66,60 % en moyenne (**Tableau 24**).

Stimulation	Intervalle	Max/min	Moyenne	Variabilité relative (%)	n
KCl	1.04 - 2.83	2.72	1.88 (±0.54)	28.77	16
IBMX 10^{-5}M	0.51 - 1.61	3.13	1.03 (±0.37)	36.27	16
IBMX 10^{-4}M	2.21 - 5.55	2.52	3.36 (±0.90)	26.86	16
MIX 10^{-5}M	1.07 - 2.93	2.73	1.93 (±0.43)	22.45	16
MIX 10^{-4}M	2.55 - 5.46	2.14	3.92 (±0.85)	21.68	16
ISO 10^{-5}M	0.28 - 0.98	3.55	0.66 (±0.21)	32.37	16
ISO 10^{-4}M	0.61 - 2.73	4.46	1.28 (±0.56)	44.14	16
2-5DP 10^{-5}M	0.26 - 0.86	3.34	0.61 (±0.19)	30.51	16
2-5DP 10^{-4}M	0.83 - 2.49	3.01	1.60 (±0.46)	29.00	16

Tableau 22: Amplitudes maximales en mV des réponses obtenues en condition standard sur le septum du rat.

Stimulation	Intervalle	Max/min	Moyenne	Variabilité relative	n
KCl	0.83 - 4.29	5.20	1.84 (±0.95)	51.57	16
IBMX 10^{-5}M	0.37 - 1.49	4.09	0.87 (±0.33)	37.80	16
IBMX 10^{-4}M	0.99 - 3.90	3.95	2.38 (±0.78)	32.87	16
MIX 10^{-5}M	0.72 - 2.05	2.84	1.35 (±0.43)	32.27	16
MIX 10^{-4}M	1.57 - 3.62	2.31	2.50 (±0.67)	26.91	16
ISO 10^{-5}M	0.25 - 0.60	2.36	0.45 (±0.12)	27.35	16
ISO 10^{-4}M	0.41 - 1.95	4.71	0.91 (±0.39)	42.98	16
2-5DP 10^{-5}M	0.15 - 0.63	4.09	0.42 (±0.15)	34.90	16
2-5DP 10^{-4}M	0.40 - 1.83	4.52	1.12 (±0.42)	37.04	16

Tableau 23 : Amplitudes maximales en mV des réponses obtenues en condition standard sur le cornet du rat.

Stimulation	Intervalle	Max/min	Moyenne	Variabilité relative (%)	n
KCl	0.42 - 2.65	6.29	1.61 (±0.60)	37.11	20
IBMX 10^{-5}M	0.09 - 1.08	12.13	0.38 (±0.25)	66.60	20
IBMX 10^{-4}M	0.56 - 2.09	3.70	1.15 (±0.45)	39.24	20
MIX 10^{-5}M	0.18 - 1.07	5.85	0.58 (±0.24)	41.30	20
MIX 10^{-4}M	0.52 - 1.77	3.42	1.18 (±0.36)	30.21	20
ISO 10^{-5}M	0.08 - 0.41	5.24	0.21 (±0.10)	47.32	20
ISO 10^{-4}M	0.16 - 0.66	4.14	0.38 (±0.13)	35.27	20
2-5DP 10^{-5}M	0.11 - 0.49	4.54	0.22 (±0.09)	42.87	20
2-5DP 10^{-4}M	0.19 - 0.75	4.00	0.46 (±0.15)	33.25	20

Tableau 24 : Amplitudes maximales en mV des réponses obtenues en condition standard sur le septum de souris.

2. Effets de l'application de bloqueurs de MRP1 et de MDR1 sur la réponse olfactive

a) Effets du vérapamil

Le vérapamil est connu entre autre pour être un bloqueur de MDR1. Dans le chapitre précédent on a montré qu'en présence de vérapamil le chargement de calcéine-AM dans la muqueuse olfactive a tendance à être amélioré chez le rat nouveau-né, tandis que l'effet est significatif chez la souris pour une concentration de 200 µM. Nous cherchons à savoir si l'application de vérapamil a un effet, d'un point de vue fonctionnel, sur la réponse olfactive chez le rat et la souris adulte. Nous avons appliqué le vérapamil à 200 µM et 400 µM sans voir de différence dans les résultats. L'étude complète a été effectuée avec vérapamil 200 µM, ce sont les résultats avec cette concentration qui sont présentés ci-après.

En présence de vérapamil à 200 µM les EOG enregistrés en réponse à une stimulation avec du KCl 140mM, de l'IBMX, un mélange d'odorants, de l'acétate d'isoamyle et de la 2,5-diméthyle pyrazine chacun à 10^{-5}M et 10^{-4}M ont tendance à voir leur amplitude maximale diminuée par rapport à la condition standard effectuée précédemment (**Figure 68**). Cette tendance se vérifie aussi bien chez la souris, sur le septum et le cornet de rat. Après rinçage, lorsqu'une diminution a été observée en présence de bloqueur, on observe systématiquement une récupération partielle voire complète dans quelques cas de l'amplitude enregistrée en condition standard.

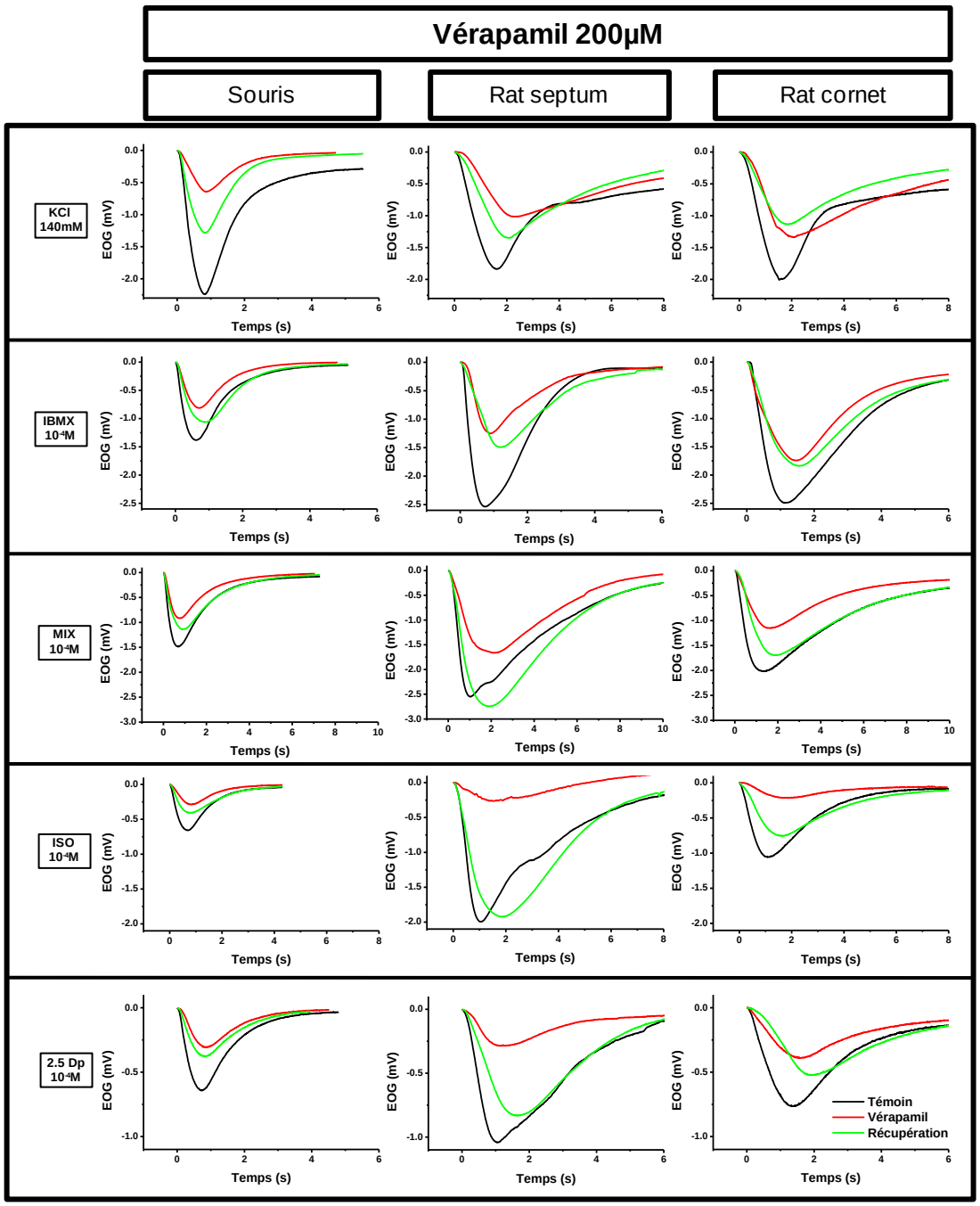


Figure 68 : Traces d'EOG obtenues sur un seul septum de souris, un seul septum de rat et un seul cornet de rat représentatifs des réponses obtenues après différentes stimulations. Les stimulations autres que KCl ont été effectuées à 10^{-5}M et 10^{-4}M. Par soucis de lisibilité, seules les réponses aux stimulations à 10^{-4}M sont représentées. Les traces noires représentent les EOG en réponse à une stimulation dans la condition standard. Les traces rouges représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations en présence de vérapamil 200 µM. Les traces vertes représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations après rinçage de la préparation.

Chez la souris, la moyenne des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre enregistrements pour chaque stimulation est toujours inférieure en présence de vérapamil 200 µM comparée à celle obtenue dans la condition standard (Figure **69**). Cela dit, comme souligné dans le paragraphe précédent, on observe une grande variabilité des EOG en réponse à la même stimulation chez des animaux différents. Cette variabilité se manifeste par un grand écart type. Ainsi, chez la souris seules les réponses au mélange à 10^{-5}M et 10^{-4}M ainsi que les réponses aux 2,5-diméthyle pyrazine à 10^{-4}M présentent une réduction significative ($p>0,05$) de leurs amplitudes maximales en présence de vérapamil 200 µM (**Tableau 25**).

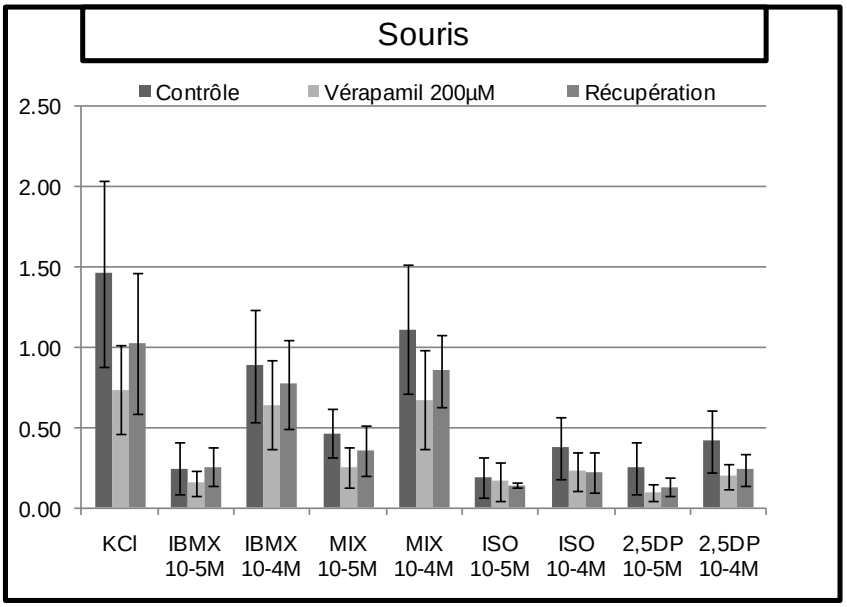


Figure **69 : Diagramme en bâtons représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations chez la souris dans la condition standard, en présence de vérapamil 200 µM et après rinçage de la préparation.** Les amplitudes maximales sont évaluées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilté relative (%)	Moyenne avec Vérapamil 200µM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	1.46 (±0.58)	39.57	0.73 (±0.28)	37.69	0.0994	4
IBMX 10^{-5}M	0.24 (±0.16)	66.84	0.15 (±0.07)	48.57	0.1862	4
IBMX 10^{-4}M	0.88 (±0.35)	39.52	0.64 (±0.28)	43.28	0.1747	4
MIX 10^{-5}M	0.46 (±0.15)	32.92	0.25 (±0.12)	49.84	0.0008	4
MIX 10^{-4}M	1.11 (±0.40)	36.10	0.67 (±0.31)	45.30	0.0042	4
ISO 10^{-5}M	0.19 (±0.13)	65.75	0.16 (±0.12)	72.98	0.4936	4
ISO 10^{-4}M	0.37 (±0.20)	52.43	0.23 (±0.12)	52.18	0.1892	4
2,5DP 10^{-5}M	0.25 (±0.16)	65.00	0.09 (±0.05)	56.91	0.0814	4
2,5DP 10^{-4}M	0.42 (±0.19)	45.97	0.19 (±0.08)	42.38	0.0427	4

Tableau 25 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition chez la souris. Soit dans la condition standard soit en présence de vérapamil 200 µM. La variabilité relative est obtenu suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

Chez le rat, que ce soit sur le septum (**Figure 70**) ou le cornet (**Figure 71**), le constat est presque identique. La moyenne des amplitudes mesurées pour chaque stimulation est toujours supérieure dans la condition standard comparée à celle obtenue en présence de vérapamil 200 µM. La grande variabilité des réponses entraine également de grands écarts types. Sur le septum, les réponses au mélange 10^{-4}M, à l'acétate d'isoamyle 10^{-5}M et 10^{-4}M ainsi qu'à la 2-5 diméthyle pyrazine 10^{-4}M présentent une diminution significative de leur amplitude maximale en présence de vérapamil 200 µM (**Tableau 26**). Sur le cornet, ce sont les réponses au mélange 10^{-4}M, à l'acétate d'isoamyle 10^{-4}M et à la 2,5 diméthyle pyrazine 10^{-5}M et 10^{-4}M qui présentent une diminution significative de leur amplitude maximale (Tableau **27**).

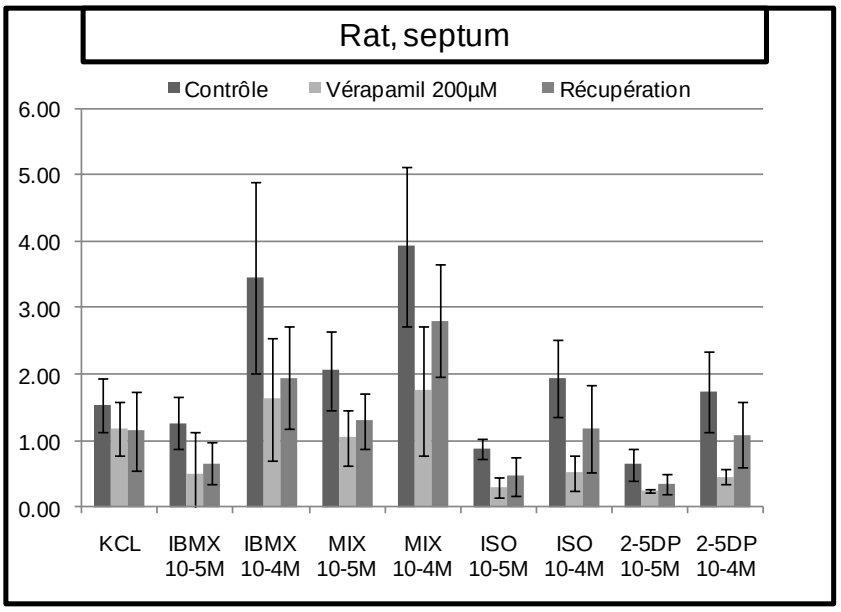


Figure 70 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations sur le septum de rat dans la condition standard, en présence de vérapamil 200 µM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec Vérapamil 200µM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	1.53 (±0.41)	26.73	1.18 (±0.39)	33.22	0.4116	4
IBMX 10^{-5}M	1.26 (±0.39)	30.87	0.49 (±0.64)	129.40	0.0592	4
IBMX 10^{-4}M	3.45 (±1.44)	41.59	1.63 (±0.92)	56.56	0.1217	4
MIX 10^{-5}M	2.06 (±0.60)	28.93	1.05 (±0.42)	39.92	0.1212	4
MIX 10^{-4}M	3.92 (±1.19)	30.35	1.76 (±0.98)	55.55	0.0227	4
ISO 10^{-5}M	0.87 (±0.15)	17.30	0.30 (±0.15)	50.66	0.0045	4
ISO 10^{-4}M	1.94 (±0.57)	29.57	0.52 (±0.27)	51.69	0.0195	4
2,5DP 10^{-5}M	0.65 (±0.24)	37.25	0.24 (±0.03)	11.07	0.0527	4
2,5DP 10^{-4}M	1.74 (±0.61)	34.93	0.46 (±0.12)	26.30	0.0189	4

Tableau 26 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition sur le septum de rat. Soit dans la condition standard soit en présence de vérapamil 200 µM. La variabilité relative est obtenu suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

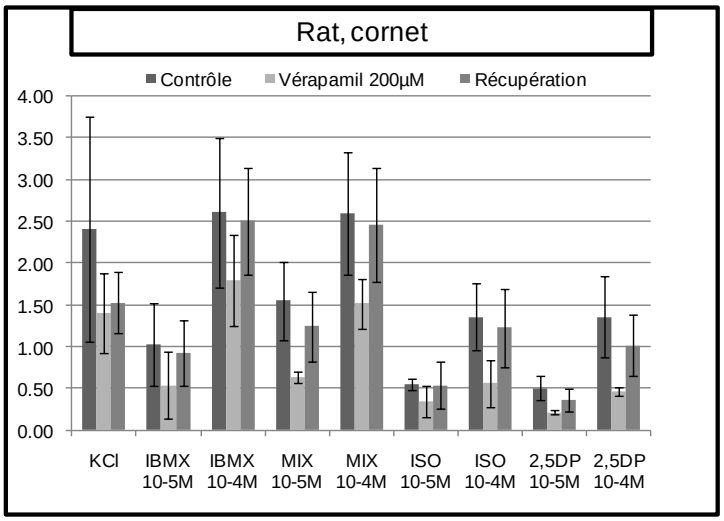


Figure 71 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations sur le cornet de rat dans la condition standard, en présence de vérapamil 200 µM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

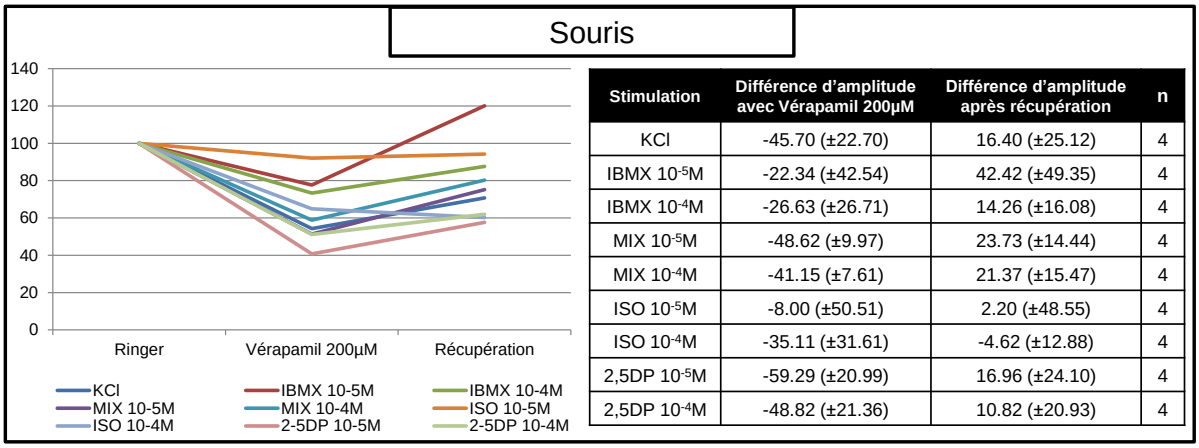
Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec Vérapamil 200µM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	2.41 (±1.34)	55.74	1.39 (±0.48)	34.18	0.1033	4
IBMX 10^{-5}M	1.03 (±0.49)	47.82	0.54 (±0.40)	73.71	0.1710	4
IBMX 10^{-4}M	2.61 (±0.89)	34.34	1.80 (±0.54)	30.14	0.2087	4
MIX 10^{-5}M	1.55 (±0.46)	30.06	0.64 (±0.07)	11.20	0.0200	4
MIX 10^{-4}M	2.59 (±0.73)	28.06	1.51 (±0.30)	20.08	0.0207	4
ISO 10^{-5}M	0.55 (±0.06)	11.88	0.34 (±0.19)	54.99	0.0688	4
ISO 10^{-4}M	1.35 (±0.40)	29.81	0.56 (±0.28)	49.86	0.0038	4
2,5DP 10^{-5}M	0.50 (±0.14)	28.51	0.22 (±0.02)	11.20	0.0173	4
2,5DP 10^{-4}M	1.35 (±0.49)	35.96	0.46 (±0.06)	12.04	0.0261	4

Tableau **27 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition sur le cornet de rat.** Soit dans la condition standard soit en présence de vérapamil 200 µM. La variabilité relative est obtenu suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

Les amplitudes maximales mesurées en présence de vérapamil 200 µM et après récupération sont normalisées, rapportées à l'amplitude maximale de leurs conditions standards respectives. Ainsi on a calculé la valeur relative de la diminution d'amplitude.

Chez la souris, l'effet du vérapamil 200 µM est minimal pour l'acétate d'isoamyle 10^{-5}M, avec une diminution moyenne de 8 % et une récupération moyenne de 2,20 % (Figure **72**). L'effet est maximal pour la 2,5 diméthyle pyrazine 10^{-5}M avec une diminution de 59,29 % et une récupération de

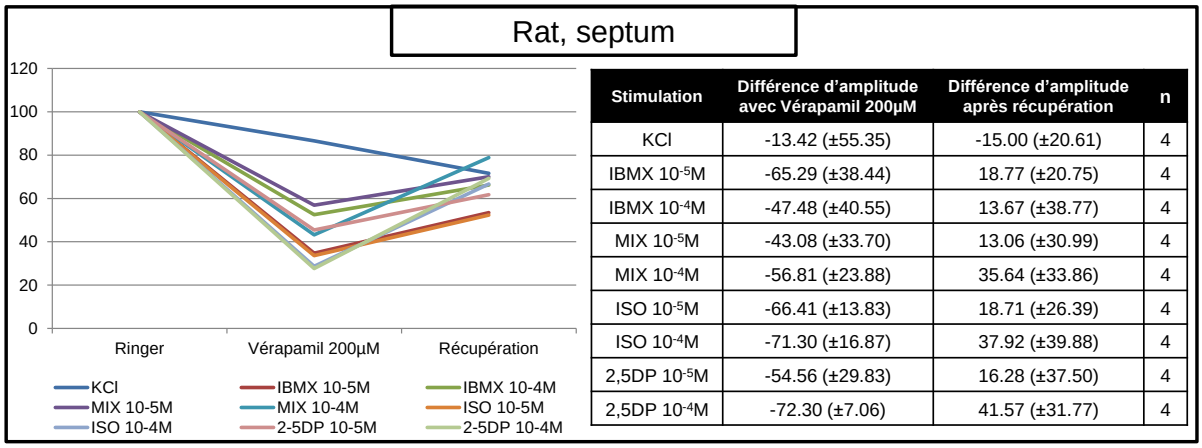
16,96 %. On observe deux valeurs particulières pour la récupération. Une récupération d'une valeur supérieure à la condition standard respective pour l'IBMX 10^{-5}M et une absence de récupération, pour l'acétate d'isoamyle 10^{-4}M.



Stimulation	Différence d'amplitude avec Vérapamil 200µM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-45.70 (±22.70)	16.40 (±25.12)	4
IBMX 10^{-5}M	-22.34 (±42.54)	42.42 (±49.35)	4
IBMX 10^{-4}M	-26.63 (±26.71)	14.26 (±16.08)	4
MIX 10^{-5}M	-48.62 (±9.97)	23.73 (±14.44)	4
MIX 10^{-4}M	-41.15 (±7.61)	21.37 (±15.47)	4
ISO 10^{-5}M	-8.00 (±50.51)	2.20 (±48.55)	4
ISO 10^{-4}M	-35.11 (±31.61)	-4.62 (±12.88)	4
2,5DP 10^{-5}M	-59.29 (±20.99)	16.96 (±24.10)	4
2,5DP 10^{-4}M	-48.82 (±21.36)	10.82 (±20.93)	4

Figure **72 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard.** Moyennes obtenues chez la souris à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

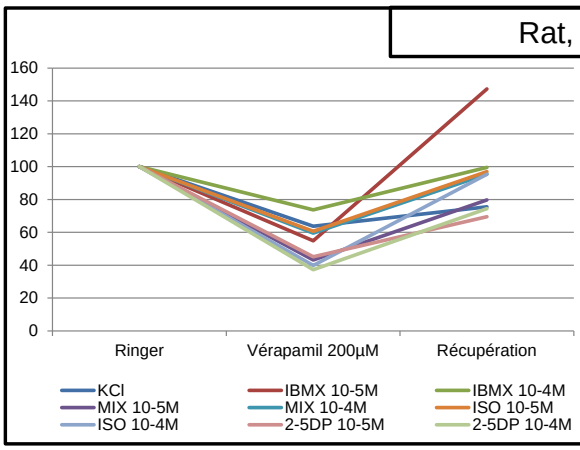
Chez le rat, sur le septum (**Figure 73**), l'effet du vérapamil est minimal, en dehors du KCl, pour le mélange 10^{-4}M avec une diminution de 43,08 % et une récupération de 13,06 %. L'effet est maximal pour la 2,5 diméthyle pyrazine 10^{-4}M avec une diminution de 72,30 % et une récupération de 41,57 %. Le KCl est particulier, il présente une diminution de 13,42 % suivie d'une autre diminution de 15 % après rinçage.



Stimulation	Différence d'amplitude avec Vérapamil 200µM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-13.42 (±55.35)	-15.00 (±20.61)	4
IBMX 10^{-5}M	-65.29 (±38.44)	18.77 (±20.75)	4
IBMX 10^{-4}M	-47.48 (±40.55)	13.67 (±38.77)	4
MIX 10^{-5}M	-43.08 (±33.70)	13.06 (±30.99)	4
MIX 10^{-4}M	-56.81 (±23.88)	35.64 (±33.86)	4
ISO 10^{-5}M	-66.41 (±13.83)	18.71 (±26.39)	4
ISO 10^{-4}M	-71.30 (±16.87)	37.92 (±39.88)	4
2,5DP 10^{-5}M	-54.56 (±29.83)	16.28 (±37.50)	4
2,5DP 10^{-4}M	-72.30 (±7.06)	41.57 (±31.77)	4

Figure 73 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues sur le septum de rat à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

Sur le cornet de rat (**Figure 74**), l'effet du vérapamil est minimal pour l'IBMX 10^{-4}M avec une diminution de 26,36 % et une récupération de 25,89 %. L'effet est maximal pour la 2-5-diméthyle pyrazine 10^{-4}M avec une diminution de 62,79 % et une récupération de 37,26 %. L'IBMX 10^{-5}M évoque comme chez la souris une amplitude de réponse après rinçage supérieure à celle de la condition standard.



Stimulation	Différence d'amplitude avec Vérapamil 200µM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-36.33 (±15.44)	11.85 (±34.19)	4
IBMX 10^{-5}M	-45.20 (±37.69)	92.52 (±171.40)	4
IBMX 10^{-4}M	-26.36 (±31.52)	25.89 (±23.15)	4
MIX 10^{-5}M	-56.81 (±9.25)	36.53 (±4.82)	4
MIX 10^{-4}M	-40.53 (±8.67)	36.04 (±15.73)	4
ISO 10^{-5}M	-39.43 (±28.88)	36.35 (±45.50)	4
ISO 10^{-4}M	-60.13 (±12.94)	55.42 (±45.45)	4
2,5DP 10^{-5}M	-54.86 (±10.08)	24.29 (±8.80)	4
2,5DP 10^{-4}M	-62.79 (±10.49)	37.26 (±5.88)	4

Figure 74 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues sur le cornet de rat à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

Les traces d'EOG sont également normalisées par rapport à leurs amplitudes maximales respectives puis moyennées. Les traces moyennes pour chaque stimulation dans les trois conditions sont rassemblées dans un même graphique (**Figure 75**). Cette disposition permet de comparer la cinétique moyenne des EOG entre les différentes conditions. Compte tenu des variations rencontrées entre chaque animal, la cinétique, phase ascendante et descendante, semble peu affectée par le vérapamil. En effet, chez la souris et chez le rat, les traces d'EOG en réponse aux stimulations avec KCl, IBMX 10^{-5}M et 10^{-4}M, le mélange à 10^{-5}M et 10^{-4}M ainsi que la 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-4}M dans la condition standard présentent un profil quasiment similaire à la condition avec vérapamil. Les traces en réponse à l'acétate d'isoamyle 10^{-5}M et 10^{-4}M et 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M présentent une phase ascendante sensiblement plus lente en présence de vérapamil comparée à la condition standard.

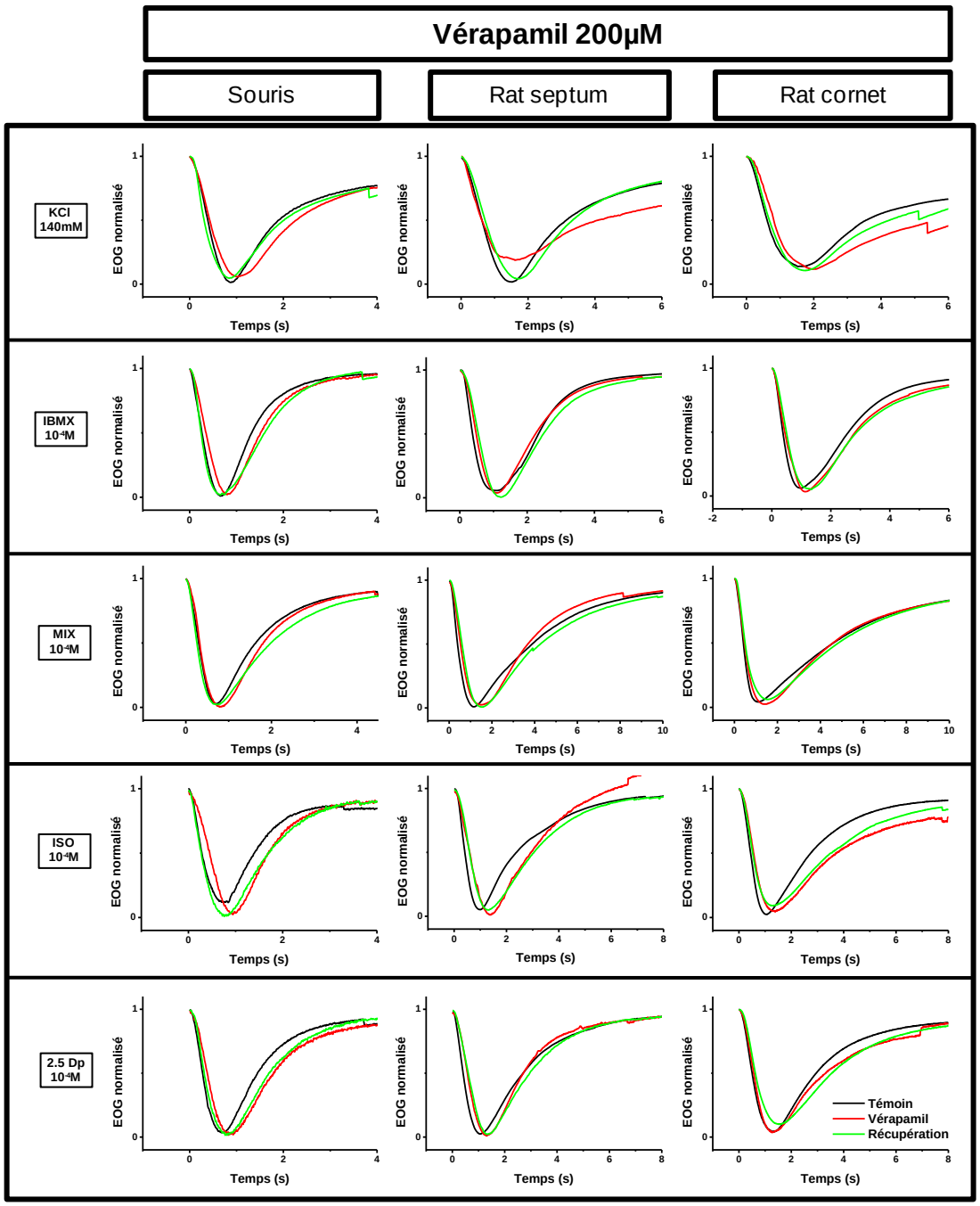


Figure 75 : Traces d'EOG normalisées et moyennées obtenues sur le septum de souris, le septum et le cornet de rat en réponse à plusieurs stimulations. Ces traces moyennes sont obtenues à partir des quatre traces obtenues dans la même condition préalablement normalisées sur leur amplitude maximale. Les stimulations autres que KCl ont été effectuées à 10^{-5}M et 10^{-4}M. Par soucis de lisibilité, seules les réponses aux stimulations à 10^{-4}M sont représentées. Les traces noires représentent les EOG en réponse à une stimulation dans la condition standard. Les traces rouges représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations en présence de vérapamil 200 µM. Les traces vertes représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations après rinçage de la préparation.

On a regardé l'évolution de l'amplitude maximale en fonction de la concentration pour chaque stimulation (**Figure 76**). Que ce soit chez la souris ou le rat, la valeur moyenne de Vmax est toujours plus faible en présence de vérapamil. La dépendance à la concentration de la réponse olfactive est maintenue en présence du bloqueur. Les droites représentant l'évolution de l'amplitude en fonction de la concentration sont sensiblement parallèles, compte tenu des grands écarts type obtenus à 10^{-4}M.

b) Effets de la cyclosporine A

La cyclosporine A comme le vérapamil est connu entre autre pour être un bloqueur de MDR1. Dans le chapitre précédent, on a montré qu'en présence de cyclosporine A 5 µM, le chargement de calcéine-AM dans la muqueuse olfactive a tendance à être amélioré, tandis que l'effet est significatif à 10 µM. Cet effet a été observé aussi bien chez la souris que chez le rat nouveau né. Nous cherchons à savoir si l'application de cyclosporine a un effet, d'un point de vue fonctionnel, sur la réponse olfactive chez le rat et la souris adulte. Nous avons utilisé la cyclosporine A à 5 µM, 10 µM et 15 µM. Nous n'avons pas observé de différence entre ces trois concentrations. L'étude complète a été effectuée avec vérapamil 200 µM, ce sont les résultats obtenus avec cette concentration qui sont présentés ci-après.

Les EOG en réponse aux stimulations avec KCl 140mM, IBMX, MIX, acétate d'isoamyle et 2,5 - diméthyle pyrazine à 10^{-5}M et 10^{-4}M ne semblent pas, en général, affectés par l'application de cyclosporine A 5 µM. Ni chez la souris ni chez le rat (**Figure 77**).

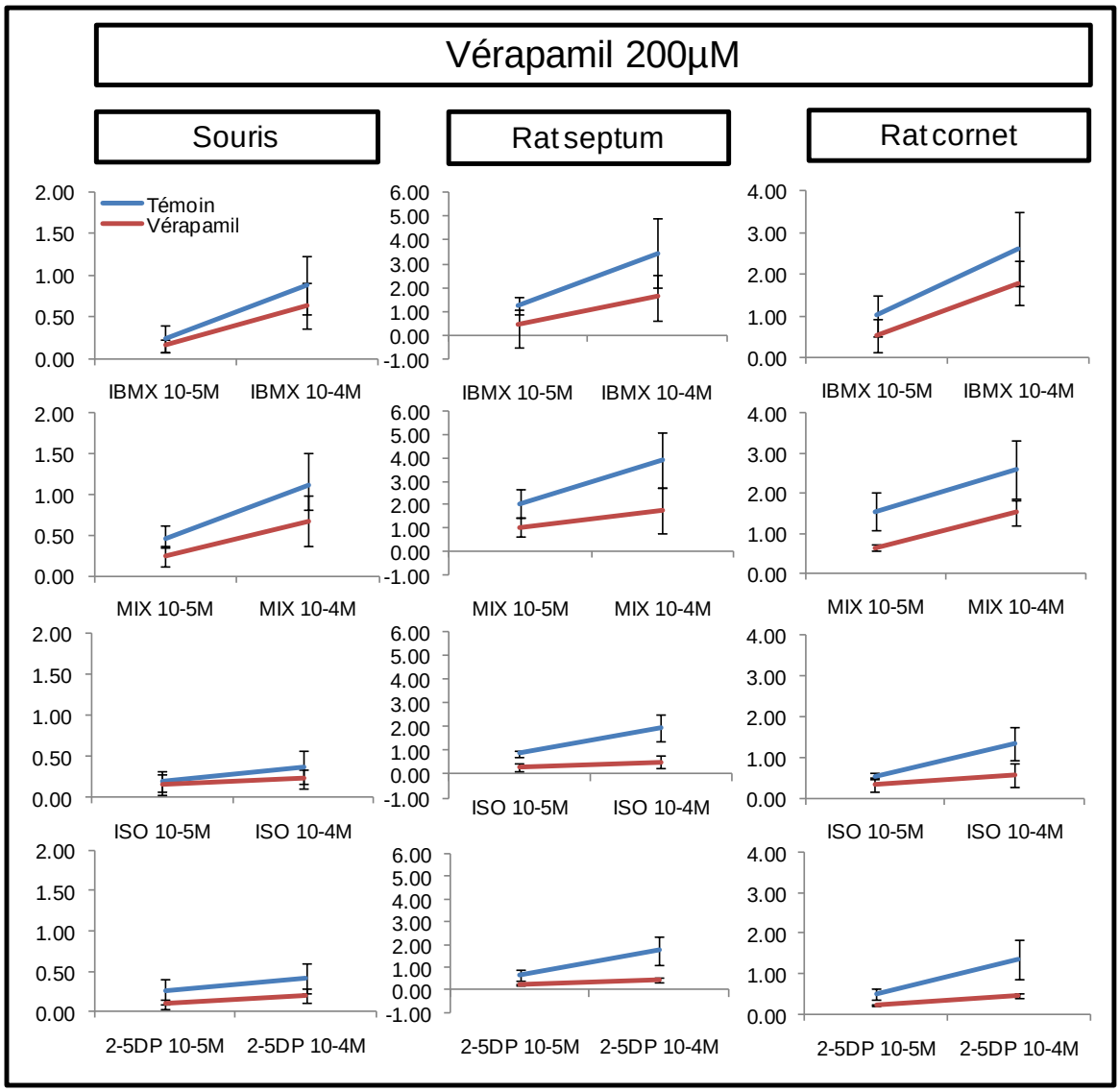


Figure 76 : Evolution de l'amplitude maximale des EOG en fonction de la concentration de la stimulation dans la condition standard comparée à la présence de vérapamil 200 µM. Les valeurs sont la moyenne des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à la même stimulation dans des conditions similaires.

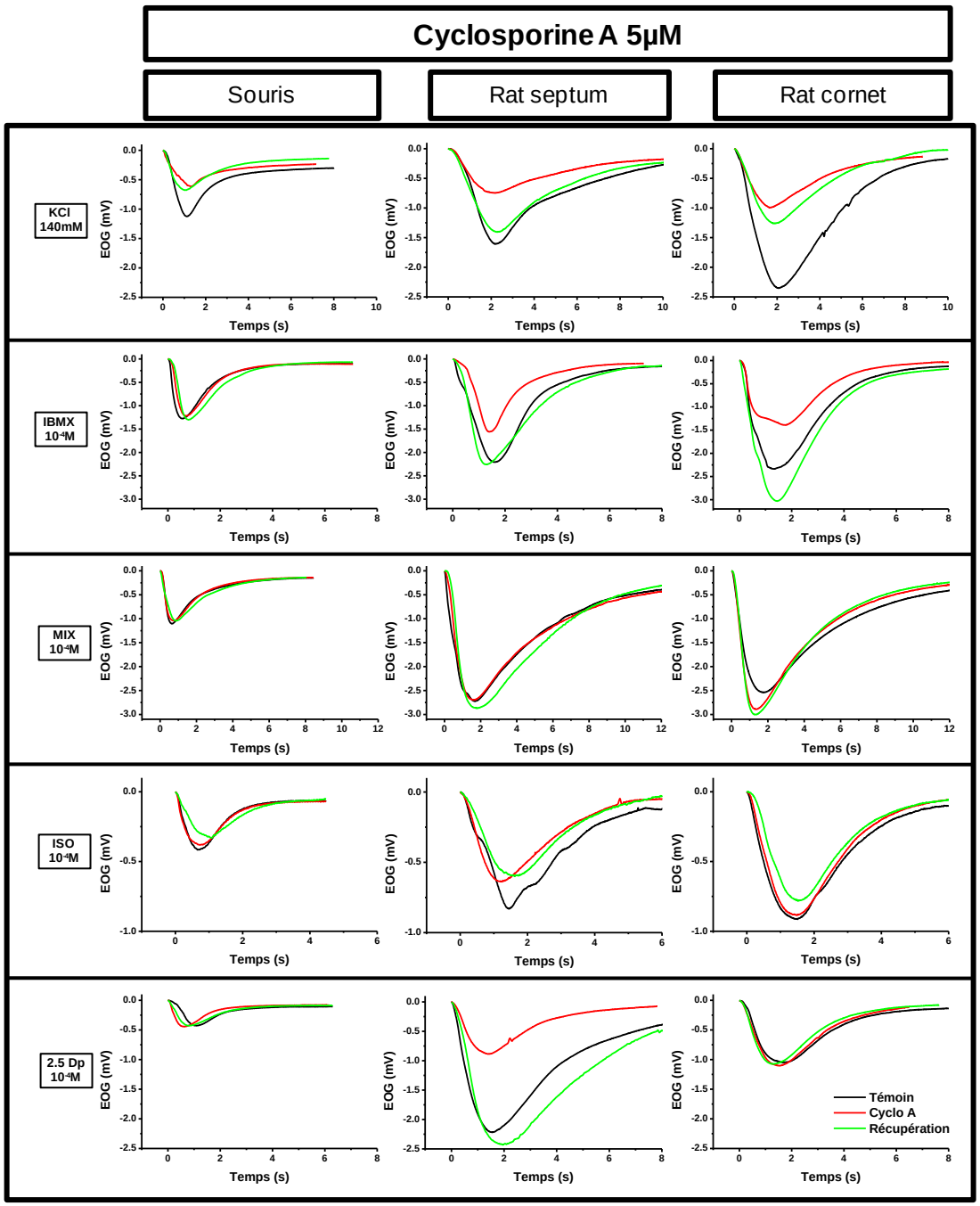


Figure 77 : Traces d'EOG obtenues sur un seul septum de souris, un seul septum de rat et un seul cornet de rat représentatifs des réponses obtenues après différentes stimulations. Les stimulations autres que KCl ont été effectuées à 10^{-5}M et 10^{-4}M. Par soucis de lisibilité, seules les réponses aux stimulations à 10^{-4}M sont représentées. Les traces noires représentent les EOG en réponse à une stimulation dans la condition standard. Les traces rouges représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations en présence de cyclosporine A 5 µM. Les traces vertes représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations après rinçage de la préparation.

Chez la souris, la moyenne des quatre amplitudes maximales mesurées pour chaque stimulation est quasiment identique en condition standard et en présence de cyclosporine A (**Figure 78**). A

l'exception du KCl qui présente une différence d'un rapport de l'ordre de 1,6 fois. Statistiquement, il n'y a aucune différence significative entre l'amplitude des réponses en présence de cyclosporine A par rapport à la condition standard. La variabilité est relativement faible, de 18,19 % pour le mélange 10^{-4}M à 34.04 % pour l'IBMX 10^{-5}M en condition standard et de 11,99 % pour l'acétate d'isoamyle 10^{-4}M à 32.87 % pour le mélange 10^{-5}M en présence de cyclosporine A si on excepte la valeur exceptionnelle du KCl et de ses 71,60 % de variabilité (**Tableau 28**).

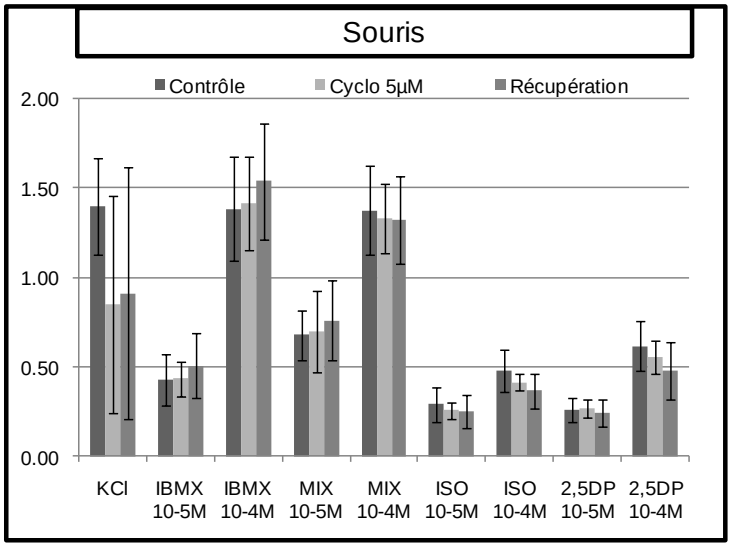


Figure 78 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations chez la souris dans la condition standard, en présence de cyclosporine A 5 µM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec Cyclo 5µM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	1.40 (±0.27)	19.18	0.85 (±0.61)	71.60	0.0780	4
IBMX 10^{-5}M	0.42 (±0.14)	34.04	0.43 (±0.09)	21.97	0.9092	4
IBMX 10^{-4}M	1.38 (±0.29)	21.08	1.41 (±0.26)	18.36	0.6503	4
MIX 10^{-5}M	0.68 (±0.14)	20.54	0.70 (±0.23)	32.87	0.8903	4
MIX 10^{-4}M	1.37 (±0.25)	18.19	1.33 (±0.19)	14.68	0.6867	4
ISO 10^{-5}M	0.29 (±0.10)	33.27	0.25 (±0.04)	17.28	0.3582	4
ISO 10^{-4}M	0.48 (±0.12)	24.99	0.41 (±0.05)	11.99	0.2744	4
2,5DP 10^{-5}M	0.26 (±0.07)	25.13	0.27 (±0.05)	18.56	0.6431	4
2,5DP 10^{-4}M	0.61 (±0.14)	22.73	0.55 (±0.09)	16.38	0.2849	4

Tableau 28 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition chez la souris. Soit dans la condition standard soit en présence de cyclosporine A 5 µM. La variabilité relative est obtenu suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

Sur le septum de rat, la moyenne des amplitudes maximales mesurées pour chaque stimulation est toujours supérieure dans la condition standard (**Figure 79**). Cela dit aucune différence n'est significative. Dans la condition standard, la variabilité va de 17,46 % pour l'acétate d'isoamyle 10^{-5}M à 39,24 % pour l'IBMX 10^{-5}M. En présence de cyclosporine A la variabilité s'étend de 33,22 % pour le mélange 10^{-5}M à 58.87 % pour l'2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M si on excepte la valeur exceptionnelle de 103,62 % de l'IBMX 10^{-5}M (Tableau **29**).

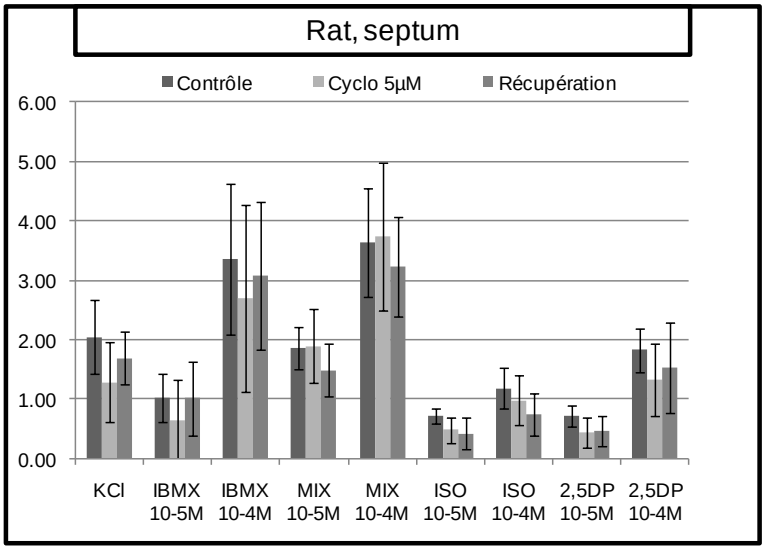


Figure 79 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations sur le septum de rat dans la condition standard, en présence de cyclosporine A 5 µM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec Cyclo 5µM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	2.04 (±0.62)	30.60	1.28 (±0.67)	52.20	0.2444	4
IBMX 10^{-5}M	1.03 (±0.60)	39.24	0.65 (±0.67)	103.62	0.1243	4
IBMX 10^{-4}M	3.35 (± .27)	37.92	2.70 (±1.58)	58.46	0.0956	4
MIX 10^{-5}M	1.86 (±0.36)	19.42	1.89 (±0.63)	33.22	0.8866	4
MIX 10^{-4}M	3.64 (±0.92)	25.16	3.74 (±1.25)	33.52	0.6418	4
ISO 10^{-5}M	0.71 (±0.12)	17.46	0.48 (±0.21)	43.49	0.1078	4
ISO 10^{-4}M	1.18 (±0.34)	29.01	0.98 (±0.41)	41.87	0.0573	4
2,5DP 10^{-5}M	0.71 (±0.18)	25.15	0.43 (±0.25)	58.87	0.0733	4
2,5DP 10^{-4}M	1.82 (±0.37)	20.54	1.33 (±0.61)	45.89	0.2131	4

Tableau **29 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulations dans la même condition sur le septum de rat.** Soit dans la condition standard soit en présence de cyclosporine A 5 µM. La variabilité relative est obtenu suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

Sur le cornet de rat, la moyenne des amplitudes pour le KCl et l'IBMX sont notablement inférieures en présence de cyclosporine A tandis qu'elles sont sensiblement identiques pour toutes les autres stimulations (Figure **80**). Dans tous les cas, il n'y a aucune différence significative. La variabilité dans la condition standard s'étends de 18,88 % pour l'IBMX 10^{-4}M à 47,64 % pour le 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M. En présence de cyclosporine A la variabilité va de 22,52 % pour le KCl à 52,96 % pour l'IBMX 10^{-5}M (**Tableau 30**).

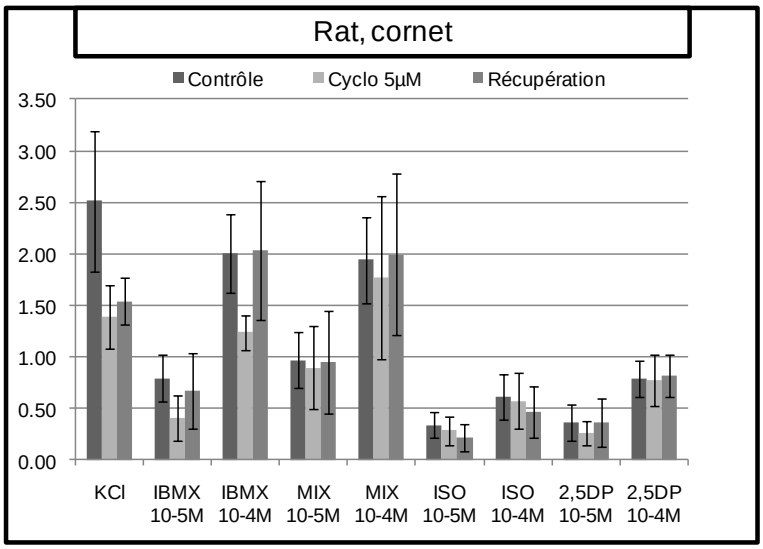
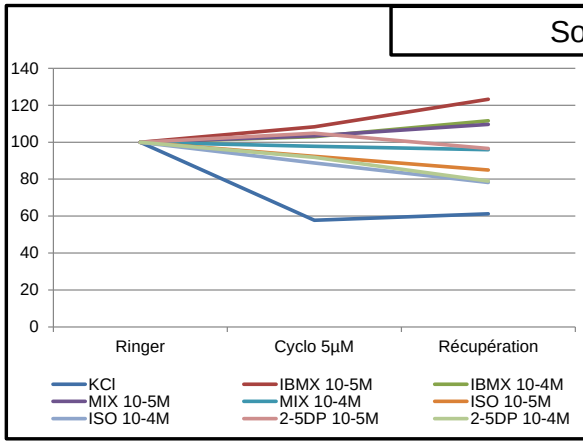


Figure **80 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations sur le cornet de rat dans la condition standard, en présence de cyclosporine A 5 µM et après rinçage de la préparation.** Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec Cyclo 5µM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	2.51 (±0.68)	27.26	1.39 (±0.31)	22.52	0.2444	4
IBMX 10^{-5}M	0.80 (±0.22)	27.72	0.41 (±0.22)	52.96	0.1243	4
IBMX 10^{-4}M	2.01 (±0.38)	18.88	1.24 (±0.16)	13.25	0.0956	4
MIX 10^{-5}M	0.97 (±0.27)	28.05	0.90 (±0.40)	45.16	0.8866	4
MIX 10^{-4}M	1.94 (±0.42)	21.54	1.77 (±0.80)	44.95	0.6418	4
ISO 10^{-5}M	0.34 (±0.13)	37.73	0.28 (±0.14)	49.33	0.1078	4
ISO 10^{-4}M	0.61 (±0.21)	34.94	0.57 (±0.28)	47.86	0.0573	4
2,5DP 10^{-5}M	0.36 (±0.17)	47.64	0.26 (±0.12)	45.82	0.0733	4
2,5DP 10^{-4}M	0.79 (±0.18)	22.72	0.77 (±0.24)	31.70	0.2131	4

Tableau 30 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition sur le cornet de rat. Soit dans la condition standard soit en présence de cyclosporine A 5 µM. La variabilité relative est obtenu suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

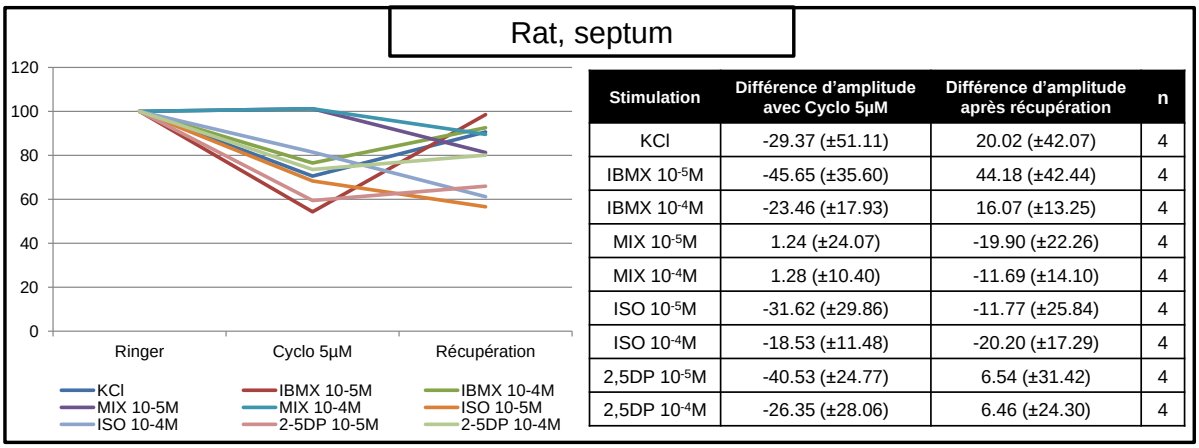
A partir des données normalisées, on observe que la cyclosporine A aurait un effet allant d'une augmentation moyenne de l'amplitude de 8,30 % pour l'IBMX 10^{-5}M avec une nouvelle augmentation de 14,97 % après rinçage jusqu'à une diminution de 11,22 % pour l'acétate d'isoamyle 10^{-4}M avec une autre baisse de 10,55 % après rinçage. On note aussi une diminution moyenne de 42,30 % pour le KCl avec une récupération moyenne de 3,47 % (**Figure 81**).



Stimulation	Différence d'amplitude avec Cyclo 5µM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-42.30 (±32.12)	3.47 (±35.24)	4
IBMX 10^{-5}M	8.30 (±32.66)	14.97 (±29.50)	4
IBMX 10^{-4}M	2.94 (±10.08)	8.60 (±11.28)	4
MIX 10^{-5}M	3.47 (±28.03)	6.19 (±13.18)	4
MIX 10^{-4}M	-2.21 (±16.01)	-1.87 (±5.74)	4
ISO 10^{-5}M	-7.64 (±21.22)	-7.47 (±2.58)	4
ISO 10^{-4}M	-11.22 (±15.30)	-10.55 (±25.36)	4
2,5DP 10^{-5}M	4.81 (±11.63)	-8.23 (±33.18)	4
2,5DP 10^{-4}M	-8.25 (±14.20)	-12.82 (±22.62)	4

Figure 81 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues chez la souris à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

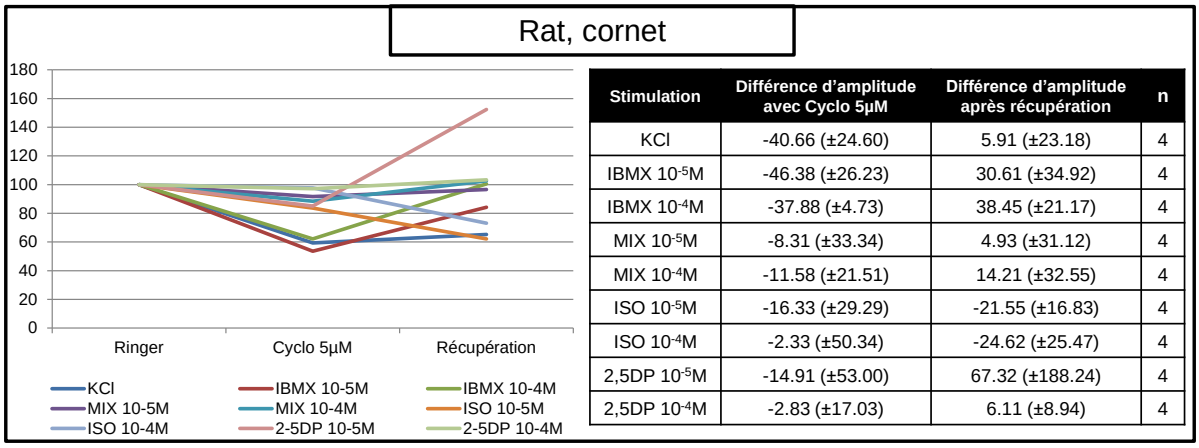
Sur le septum de rat, la cyclosporine A aurait un effet allant d'une augmentation moyenne de 1,24 % et 1,28 % pour le mélange à 10-5M et 10^{-4}M avec une diminution après rinçage respectivement de 19,90 % et 11,69 %, jusqu'à une diminution moyenne de l'amplitude maximale de 45,65 % pour l'IBMX 10^{-5}M avec une récupération moyenne de 44,18 % (**Figure 82**).



Stimulation	Différence d'amplitude avec Cyclo 5µM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-29.37 (±51.11)	20.02 (±42.07)	4
IBMX 10^{-5}M	-45.65 (±35.60)	44.18 (±42.44)	4
IBMX 10^{-4}M	-23.46 (±17.93)	16.07 (±13.25)	4
MIX 10^{-5}M	1.24 (±24.07)	-19.90 (±22.26)	4
MIX 10^{-4}M	1.28 (±10.40)	-11.69 (±14.10)	4
ISO 10^{-5}M	-31.62 (±29.86)	-11.77 (±25.84)	4
ISO 10^{-4}M	-18.53 (±11.48)	-20.20 (±17.29)	4
2,5DP 10^{-5}M	-40.53 (±24.77)	6.54 (±31.42)	4
2,5DP 10^{-4}M	-26.35 (±28.06)	6.46 (±24.30)	4

Figure 82 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues sur le septum de rat à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

Sur le cornet de rat, l'effet de la cyclosporine A irait d'une diminution moyenne de l'amplitude maximale de 2,33 % pour l'acétate d'isoamyle 10^{-4}M avec une autre diminution de 20,20 % après rinçage à une diminution de 46,38 % pour l'IBMX 10-5M avec une récupération de 30,61 % (Figure **83**).



Stimulation	Différence d'amplitude avec Cyclo 5µM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-40.66 (±24.60)	5.91 (±23.18)	4
IBMX 10^{-5}M	-46.38 (±26.23)	30.61 (±34.92)	4
IBMX 10^{-4}M	-37.88 (±4.73)	38.45 (±21.17)	4
MIX 10^{-5}M	-8.31 (±33.34)	4.93 (±31.12)	4
MIX 10^{-4}M	-11.58 (±21.51)	14.21 (±32.55)	4
ISO 10^{-5}M	-16.33 (±29.29)	-21.55 (±16.83)	4
ISO 10^{-4}M	-2.33 (±50.34)	-24.62 (±25.47)	4
2,5DP 10^{-5}M	-14.91 (±53.00)	67.32 (±188.24)	4
2,5DP 10^{-4}M	-2.83 (±17.03)	6.11 (±8.94)	4

Figure **83 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard.** Moyennes obtenues sur le cornet de rat à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

D'un point de vue cinétique, les traces moyennes obtenues en présence de cyclosporine et celles obtenues en condition standard pour chaque stimulation se superposent bien compte tenu de la variabilité des réponses. Quelques traces présentent un décallage notable comme l'IBMX 10-5M, le 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M et 10^{-4}M sur le cornet de rat (**Figure 84**).

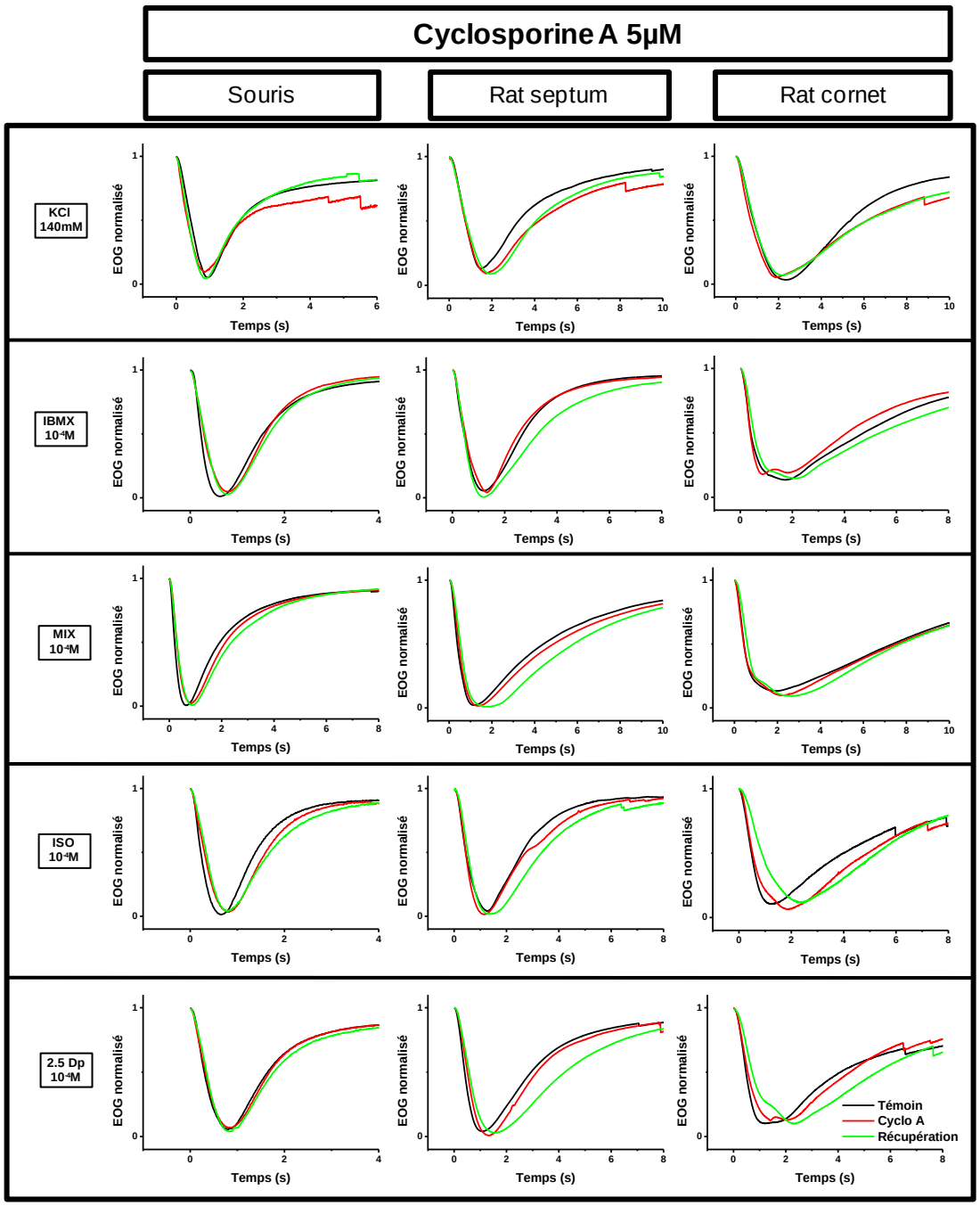


Figure 84 : Traces d'EOG normalisées et moyennées obtenues sur le septum de souris, le septum et le cornet de rat en réponse à plusieurs stimulations. Ces traces moyennes sont obtenues à partir des quatre traces obtenues dans la même condition préalablement normalisées sur leur amplitude maximale. Les stimulations autres que KCl ont été effectuées à 10^{-5}M et 10^{-4}M. Par soucis de lisibilité, seules les réponses aux stimulations à 10^{-4}M sont représentées. Les traces noires représentent les EOG en réponse à une stimulation dans la condition standard. Les traces rouges représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations en présence de cyclosporine A 5 µM. Les traces vertes représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations après rinçage de la préparation.

Si on regroupe sur un même graphique les droites représentant l'évolution de l'amplitude en fonction de la concentration pour chaque stimulation, on remarque ces droites obtenues en présence de cyclosporine A se superposent à celles obtenues dans la condition standard (**Figure 85**). Cela reflète l'absence d'effet du bloqueur sur la réponse olfactive, puisque l'amplitude de réponse est identique dans les deux conditions quelle que soit la concentration du stimulus.

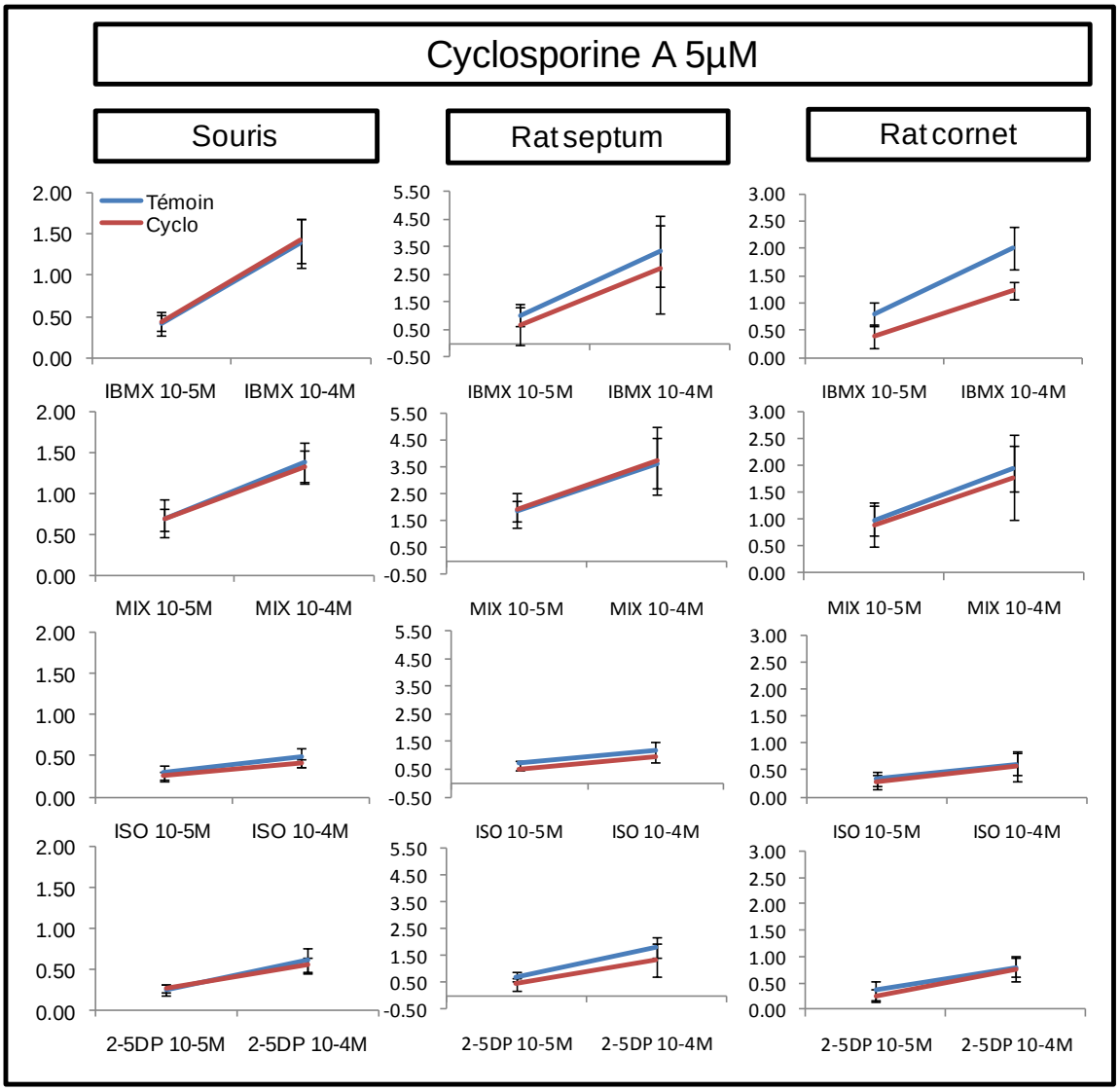


Figure 85 : Evolution de l'amplitude maximale des EOG en fonction de la concentration de la stimulation dans la condition standard comparée à la présence de cyclosporine A 5 µM. Les valeurs sont la moyenne des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à la même stimulation dans des conditions similaires.

c) Effets du MK571

Le MK571 est connu entre autres pour être un bloqueur de MRP1. Dans le chapitre précédent on a montré qu'en présence de MK571 25 µM et 50 µM, le chargement de calcéine-AM dans la muqueuse olfactive est significativement amélioré chez la souris et le rat nouveau-né. Nous cherchons à savoir si l'application de MK571 a un effet, d'un point de vue fonctionnel, sur la réponse olfactive chez le rat et la souris adulte. Nous avons remarqué que le MK571, à seulement 25 µM, a déjà un effet très important sur la réponse olfactive. Nous avons gardé cette concentration pour l'étude complète.

Que ce soit chez la souris ou le rat, tous les EOG enregistrés en présence de MK571 25 µM ont une amplitude inférieure à celle relevée en condition standard. Il y a systématiquement en plus une récupération de proportion variable après rinçage (**Figure 86**).

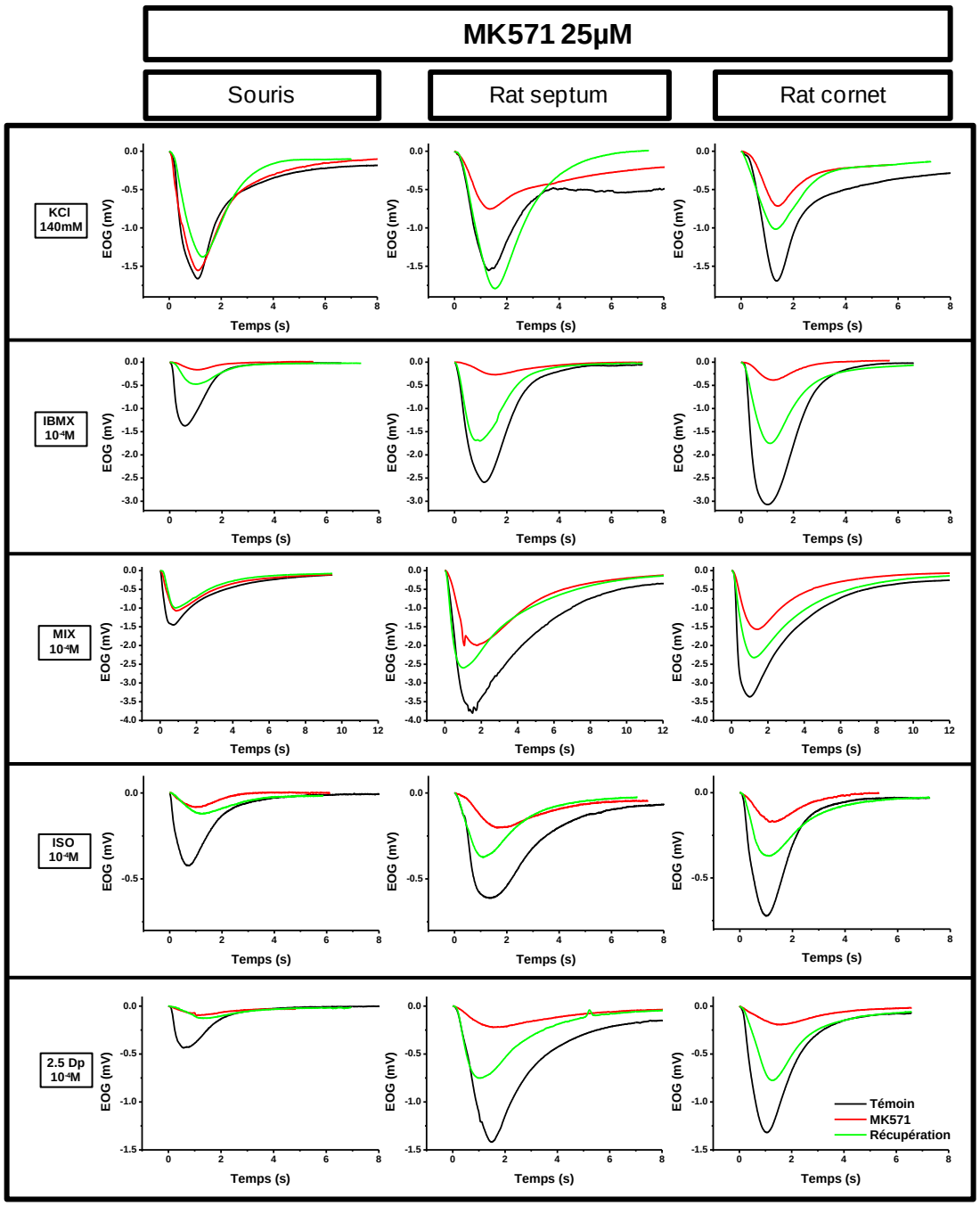


Figure 86 : Traces d'EOG obtenues sur un seul septum de souris, un seul septum de rat et un seul cornet de rat représentatifs des réponses obtenues après différentes stimulations. Les stimulations autres que KCl ont été effectuées à 10^{-5}M et 10^{-4}M. Par soucis de lisibilité, seules les réponses aux stimulations à 10^{-4}M sont représentées. Les traces noires représentent les EOG en réponse à une stimulation dans la condition standard. Les traces rouges représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations en présence de MK571 25 µM. Les traces vertes représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations après rinçage de la préparation.

Chez la souris la moyenne des quatre amplitudes mesurées pour chaque stimulation en présence de MK571 est toujours inférieure à celle de la condition standard (**Figure 87**). Cette différence est significative quasiment pour toutes les stimulations à l'exception du KCl et de l'IBMX 10^{-5}M. La variabilité du standard va de 10,31 % pour le mélange 10^{-4}M à 64,23 % pour l'IBMX 10^{-5}M. En présence de MK571 la variabilité s'étend de 35,03 % pour l'IBMX10-5M à 68,57 % pour le 2,5-diméthyle pyrazine (**Tableau 31**).

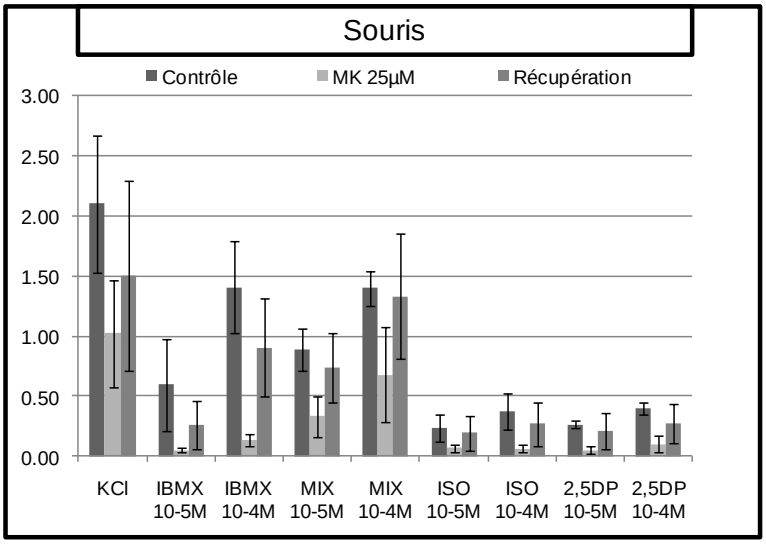


Figure 87 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations chez la souris dans la condition standard, en présence de MK571 25 µM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec MK 25µM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	2.10 (±0.57)	27.12	1.02 (±0.45)	43.84	0.0520	4
IBMX 10^{-5}M	0.59 (±0.38)	64.23	0.05 (±0.02)	35.03	0.0587	4
IBMX 10^{-4}M	1.41 (±0.38)	27.26	0.13 (±0.05)	36.12	0.0080	4
MIX 10^{-5}M	0.89 (±0.18)	19.78	0.33 (±0.17)	50.72	0.0039	4
MIX 10^{-4}M	1.40 (±0.14)	10.31	0.68 (±0.40)	58.58	0.0444	4
ISO 10^{-5}M	0.24 (±0.11)	47.68	0.07 (±0.03)	42.78	0.0320	4
ISO 10^{-4}M	0.38 (±0.15)	39.80	0.07 (±0.04)	55.55	0.0181	4
2,5DP 10^{-5}M	0.27 (±0.03)	12.62	0.05 (±0.03)	62.47	0.0000	4
2,5DP 10^{-4}M	0.40 (±0.06)	13.80	0.10 (±0.07)	68.57	0.0028	4

Tableau 31 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition chez la souris. Soit dans la condition standard soit en présence de MK571 25 µM. La variabilité relative est obtenue suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

Sur le septum de rat la moyenne des quatre amplitudes mesurées pour chaque stimulation en présence de MK571 est aussi toujours inférieure à celle de la condition standard (**Figure 88**). La différence est significative pour toutes les stimulations à l'exception du KCl. La variabilité dans la condition standard s'étend de 8,53 % pour le mélange 10^{-4}M à 33.36 % pour le KCl. En présence de MK571, la variabilité va de 38,11 % pour le mélange 10^{-4}M à 74,81 % pour le KCl (**Tableau 32**).

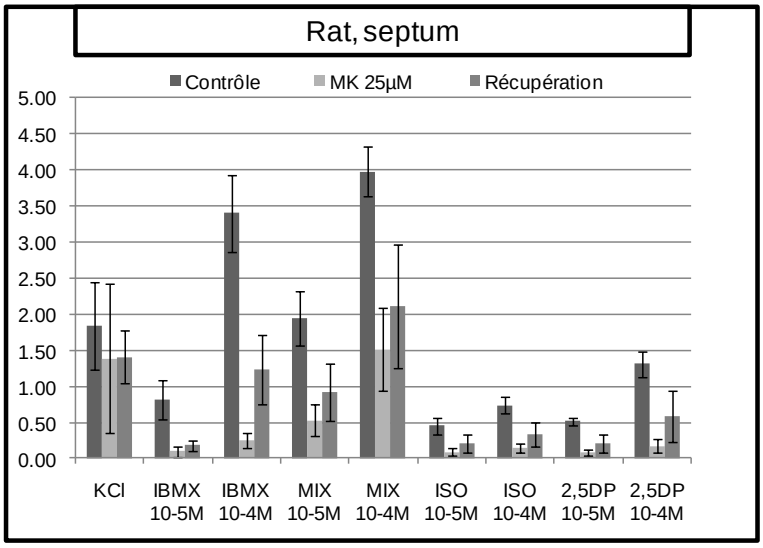


Figure 88 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations sur le septum de rat dans la condition standard, en présence de MK571 25 µM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec MK 25µM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	1.84 (±0.61)	33.36	1.39 (±1.04)	74.81	0.1457	4
IBMX 10^{-5}M	0.82 (±0.26)	32.22	0.10 (±0.07)	73.58	0.0198	4
IBMX 10^{-4}M	3.40 (±0.54)	15.90	0.24 (±0.11)	43.74	0.0017	4
MIX 10^{-5}M	1.95 (±0.38)	19.28	0.52 (±0.22)	42.08	0.0103	4
MIX 10^{-4}M	3.98 (±0.34)	8.53	1.51 (±0.57)	38.11	0.0051	4
ISO 10^{-5}M	0.45 (±0.12)	26.10	0.09 (±0.05)	56.08	0.0033	4
ISO 10^{-4}M	0.73 (±012)	15.80	0.15 (±0.07)	44.88	0.0023	4
2,5DP 10^{-5}M	0.51 (±0.05)	9.38	0.08 (±0.04)	49.95	0.0001	4
2,5DP 10^{-4}M	1.31 (±0.18)	13.59	0.17 (±0.10)	56.04	0.0003	4

Tableau 32 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition sur le septum de rat. Soit dans la condition standard soit en présence de MK571 25 µM. La variabilité relative est obtenue suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

Sur le cornet de rat, la moyenne des quatre amplitudes mesurées pour chaque stimulation en présence de MK571 est aussi toujours inférieure à celle de la condition standard (**Figure 89**). La différence est significative pour toutes les stimulations à l'exception du KCl. La variabilité dans la condition standard s'étend de 15,61 % pour l'acétate d'isoamyle 10^{-5}M à 27,43 % pour le 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M. En présence de MK571, la variabilité va de 17,86 % pour le KCl à 48,83 % pour le 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M (**Tableau 33**).

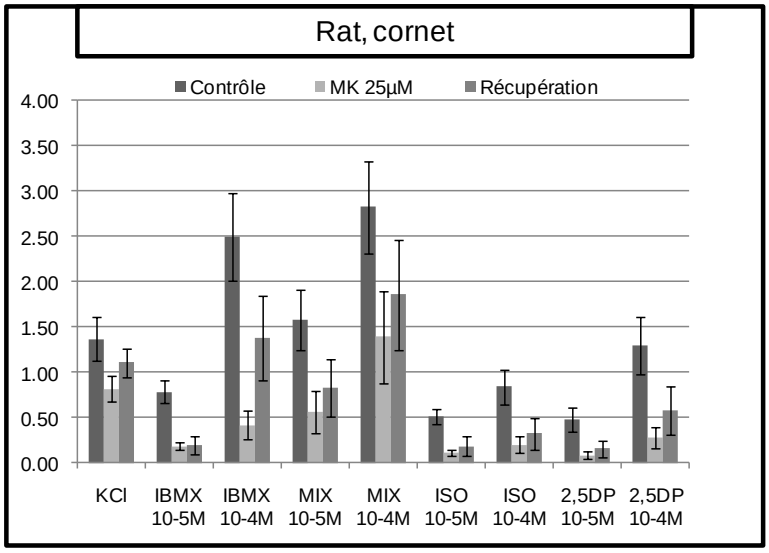
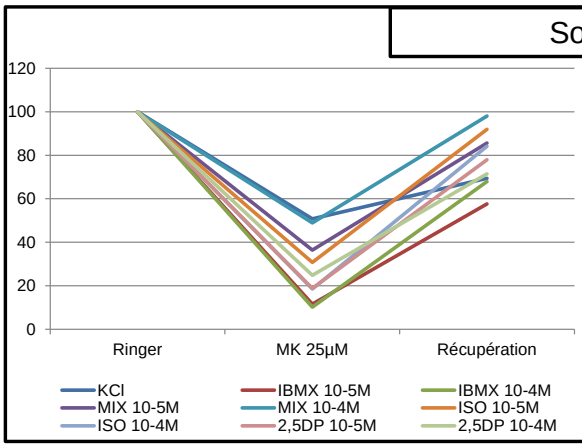


Figure 89 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations sur le cornet de rat dans la condition standard, en présence de MK571 25 µM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec MK 25µM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	1.37 (±0.24)	17.49	0.82 (±0.15)	17.86	0.0535	4
IBMX 10^{-5}M	0.78 (±0.12)	15.87	0.18 (±0.04)	22.47	0.0025	4
IBMX 10^{-4}M	2.50 (±0.48)	19.39	0.42 (±0.16)	38.81	0.0022	4
MIX 10^{-5}M	1.58 (±0.33)	20.98	0.56 (±0.23)	41.99	0.0032	4
MIX 10^{-4}M	2.82 (±0.51)	18.10	1.39 (±0.51)	36.75	0.0047	4
ISO 10^{-5}M	0.51 (±0.08)	15.61	0.10 (±0.03)	31.53	0.0006	4
ISO 10^{-4}M	0.84 (±0.19)	22.42	0.20 (±0.09)	46.38	0.0019	4
2,5DP 10^{-5}M	0.48 (±0.13)	27.43	0.08 (±0.04)	48.83	0.0043	4
2,5DP 10^{-4}M	1.29 (±0.32)	24.63	0.27 (±0.12)	42.95	0.0031	4

Tableau 33 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition sur le cornet de rat. Soit dans la condition standard soit en présence de MK571 25 µM. La variabilité relative est obtenue suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

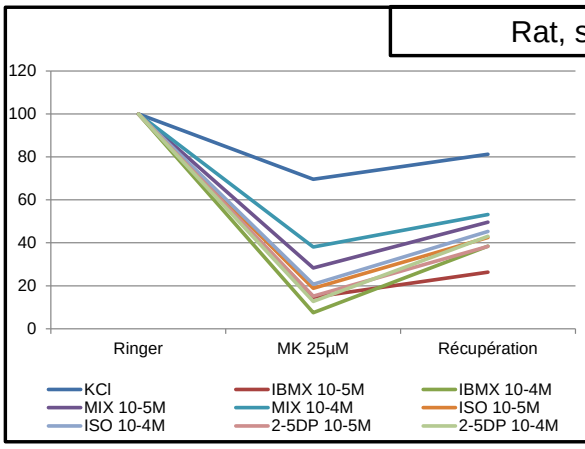
A partir de la moyenne des amplitudes normalisées chez la souris, on observe que le MK571 provoque une diminution moyenne au minimum de 49,23 % pour le KCl avec une récupération moyenne de 18,60 % et au maximum de 89,82 % pour l'IBMX 10-4M avec une récupération moyenne de 57,74 % (**Figure 90**).



Stimulation	Différence d'amplitude avec MK 25µM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-49.23 (±28.99)	18.60 (±25.08)	4
IBMX 10^{-5}M	-88.47 (±6.36)	46.05 (±43.47)	4
IBMX 10^{-4}M	-89.82 (±4.24)	57.74 (±33.16)	4
MIX 10^{-5}M	-63.62 (±14.59)	49.21 (±38.22)	4
MIX 10^{-4}M	-51.08 (±27.69)	49.16 (±46.71)	4
ISO 10^{-5}M	-69.24 (±6.76)	61.17 (±60.59)	4
ISO 10^{-4}M	-81.49 (±8.09)	65.66 (±64.38)	4
2,5DP 10^{-5}M	-81.24 (±9.86)	59.19 (±57.27)	4
2,5DP 10^{-4}M	-75.17 (±15.29)	46.66 (±47.88)	4

Figure 90 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues chez la souris à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

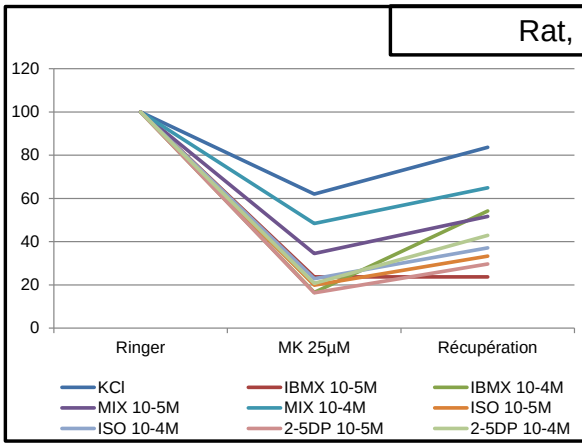
Sur le septum de rat, le MK571 provoque une diminution moyenne de l'amplitude au minimum de 30,44 % pour le KCl avec une récupération moyenne de 11,65 %. Au maximum, la diminution moyenne est de 92,56 % pour l'IBMX 10^{-4}M avec une récupération moyenne de 30,98 % (**Figure 91**).



Stimulation	Différence d'amplitude avec MK 25µM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-30.44 (±27.55)	11.65 (±30.25)	4
IBMX 10^{-5}M	-85.33 (±12.29)	11.65 (±18.50)	4
IBMX 10^{-4}M	-92.56 (±3.60)	30.98 (±20.92)	4
MIX 10^{-5}M	-71.65 (±15.27)	21.29 (±27.88)	4
MIX 10^{-4}M	-61.90 (±15.32)	15.09 (±22.44)	4
ISO 10^{-5}M	-81.21 (±8.05)	23.67 (±19.11)	4
ISO 10^{-4}M	-79.27 (±10.36)	24.60 (±22.30)	4
2,5DP 10^{-5}M	-84.80 (±6.50)	23.14 (±22.58)	4
2,5DP 10^{-4}M	-87.26 (±6.09)	30.26 (±21.03)	4

Figure 91 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues sur le septum de rat à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

Sur le cornet de rat, le MK571 provoque une diminution moyenne au minimum de 38 % pour le KCl avec une récupération moyenne de 21,65 %. Au maximum, la diminution est de 83,72 % pour le 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M avec une récupération moyenne de 13,35 % (**Figure 92**).



Stimulation	Différence d'amplitude avec MK 25µM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-38.00 (±19.15)	21.65 (±24.23)	4
IBMX 10^{-5}M	-76.34 (±6.44)	0.02 (±8.81)	4
IBMX 10^{-4}M	-83.53 (±5.44)	37.67 (±10.36)	4
MIX 10^{-5}M	-65.49 (±11.72)	17.11 (±13.27)	4
MIX 10^{-4}M	-51.57 (±14.68)	16.45 (±15.06)	4
ISO 10^{-5}M	-80.18 (±3.75)	13.50 (±17.68)	4
ISO 10^{-4}M	-77.18 (±7.60)	14.29 (±16.50)	4
2,5DP 10^{-5}M	-83.72 (±5.00)	13.35 (±12.49)	4
2,5DP 10^{-4}M	-79.32 (±5.28)	22.19 (±15.28)	4

Figure 92 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues sur le cornet de rat à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

La superposition des traces d'EOG avec ou sans MK571 préalablement normalisées puis moyennées, montre que le MK571 semble avoir un effet sur la cinétique de l'EOG en réponse à l'IBMX 10^{-5}M et 10^{-4}M chez le rat et la souris. Les EOG présentent une phase d'ascension plus longue, l'amplitude maximale est atteinte plus tardivement. Dans le reste des cas, compte-tenu de la variabilité des enregistrements, le MK571 ne semble pas avoir d'effet sur la cinétique de l'EOG (**Figure 93**).

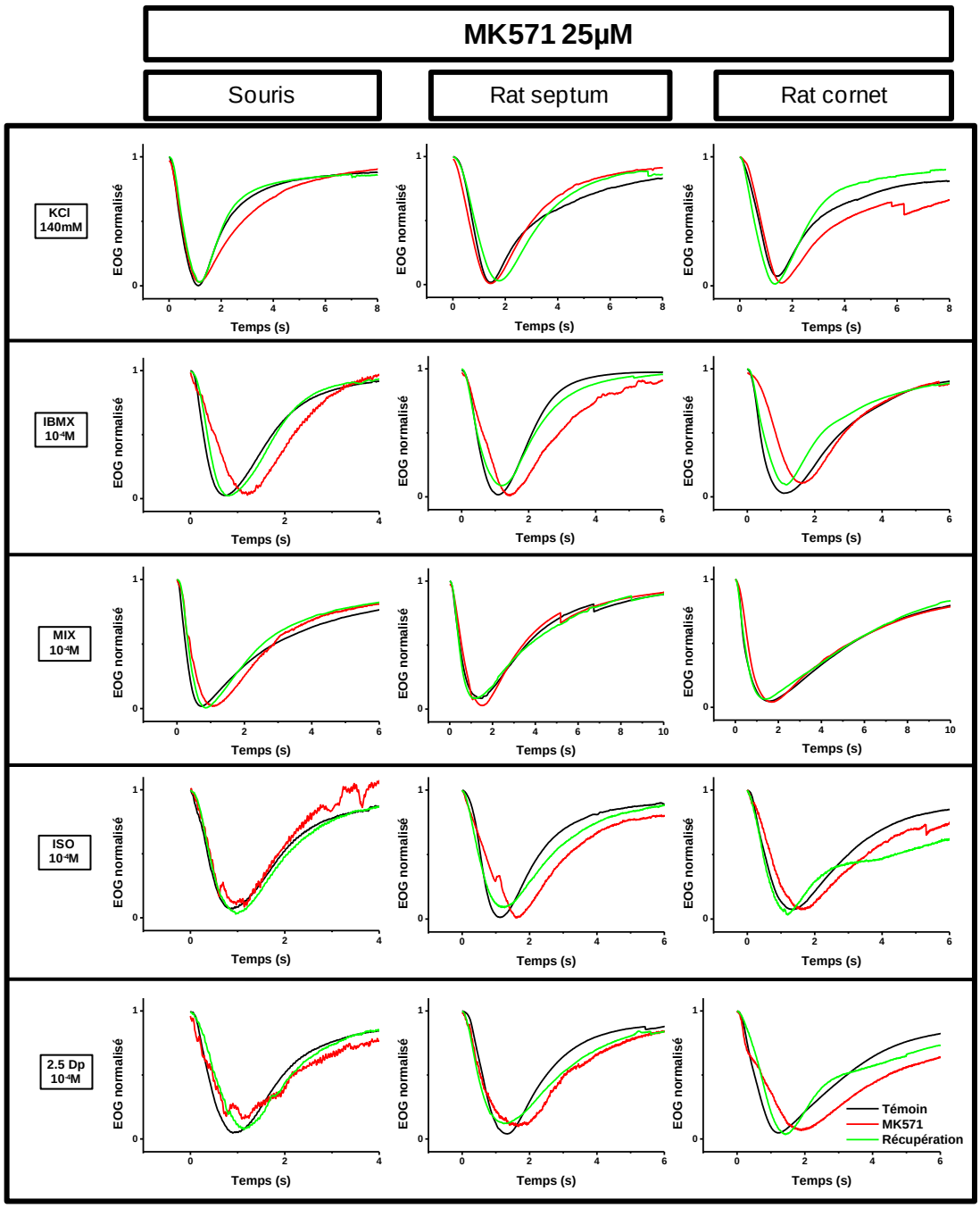


Figure 93 : Traces d'EOG normalisées et moyennées obtenues sur le septum de souris, le septum et le cornet de rat en réponse à plusieurs stimulations. Ces traces moyennes sont obtenues à partir des quatre traces obtenues dans la même condition, préalablement normalisées sur leur amplitude maximale. Les stimulations autres que KCl ont été effectuées à 10^{-5}M et 10^{-4}M. Par soucis de lisibilité, seules les réponses aux stimulations à 10^{-4}M sont représentées. Les traces noires représentent les EOG en réponse à une stimulation dans la condition standard. Les traces rouges représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations en présence de MK571 25 µM. Les traces vertes représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations après rinçage de la préparation.

L'évolution de l'amplitude de la réponse pour une concentration de 10^{-5}M à 10^{-4}M est reportée sur un graphique. Cette évolution forme une droite. Sur le même graphique, on a reporté l'évolution de l'amplitude dans la condition témoin et en présence d'un bloqueur. En présence de MK571 25 µM, la droite est toujours en dessous du témoin, puisque que le MK571 diminue l'amplitude de la réponse pour chaque stimulation. Pour toutes les stimulations, sauf IBMX, les deux droites sont quasiment parallèles, dans ce cas l'effet de l'IBMX est proportionnel à la concentration du stimulus. Pour l'IBMX, on remarque que la droite n'est pas du tout parallèle au témoin, dans ce cas le MK571 a un effet beaucoup plus important pour un stimulus à 10^{-4}M comparé à 10^{-5}M. Cet effet est valable aussi bien chez la souris que chez le rat. (**Figure 94**).

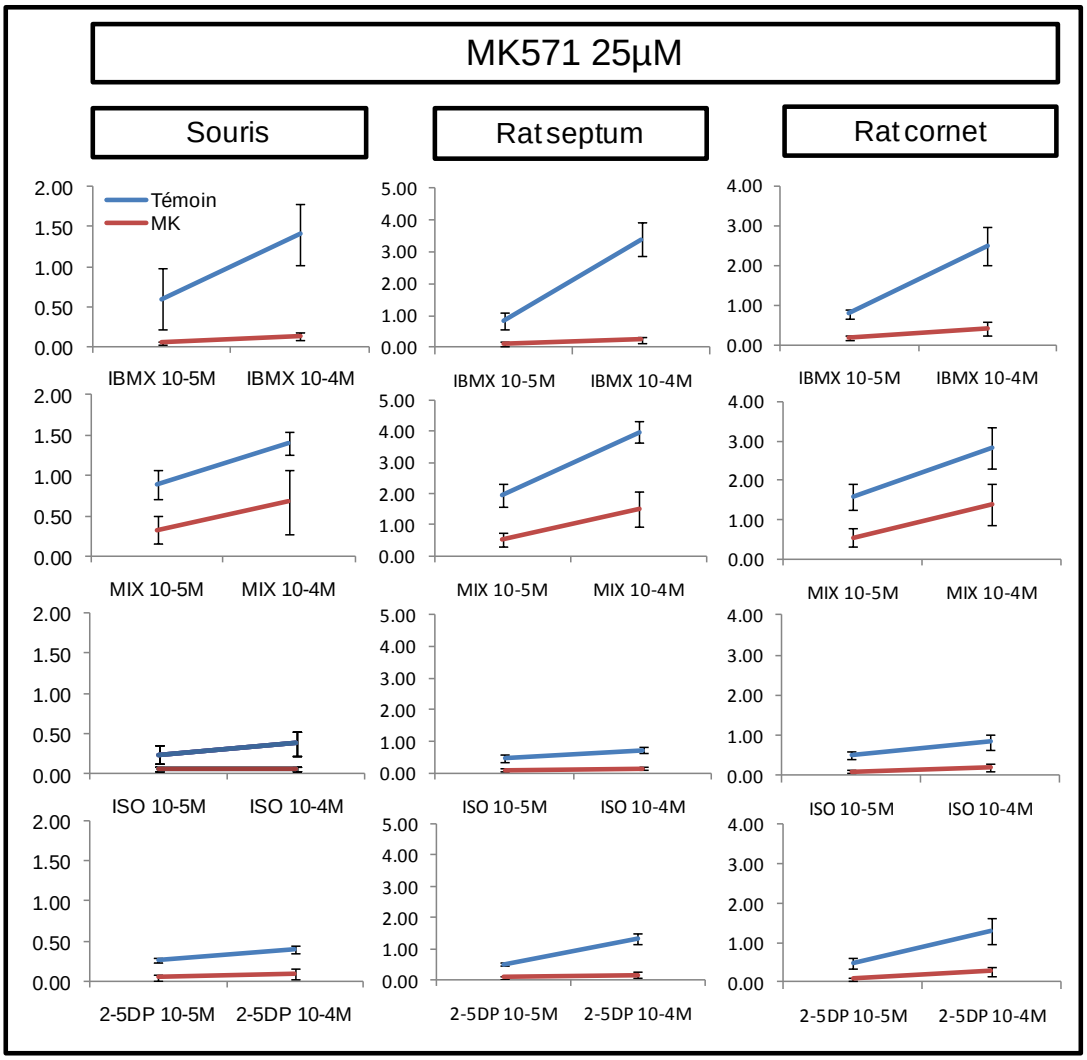


Figure 94 : Evolution de l'amplitude maximale des EOG en fonction de la concentration de la stimulation dans la condition standard comparée à la présence de MK571 25 µM. Les valeurs sont la moyenne des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à la même stimulation dans des conditions similaires.

d) Effets du probénécide

Le probénécide, comme le MK571 est connu entre autres pour être un bloqueur de MRP1. Dans le chapitre précédent on a montré qu'en présence de probénécide, le chargement de calcéine-AM dans la muqueuse olfactive est amélioré. Cet effet est significatif avec le probénécide 2,5mM chez le rat nouveau-né, tandis qu'il est significatif à une concentration de 5mM chez la souris nouveau-née. Nous cherchons à savoir si l'application de probénécide a un effet, d'un point de vue fonctionnel, sur la réponse olfactive chez le rat et la souris adulte. On a remarqué que le probénécide a un effet concentration dépendant. En effet chez la souris on a remarqué une forte augmentation de l'effet du probénécide en passant d'une concentration de 2,5mM à 5mM. Chez le rat l'effet du probénécide est déjà important à 2,5mM.

Chez la souris le probénécide 2,5mM a tendance à provoquer une diminution de l'amplitude des EOG (**Figure 95**). Cette diminution est accentuée pour l'ensemble des stimuli par l'augmentation de la concentration du probénécide à 5mM. Après rinçage, il y a toujours une récupération d'amplitude variable. Chez le rat la diminution de l'amplitude est bien marquée avec le probénécide à 2,5mM. Toutes les stimulations sont affectées par le probénécide à l'exception du KCl où l'amplitude se trouve être augmentée pour le septum, pour 2 enregistrements sur 4, et le cornet, pour 3 enregistrements sur 4.

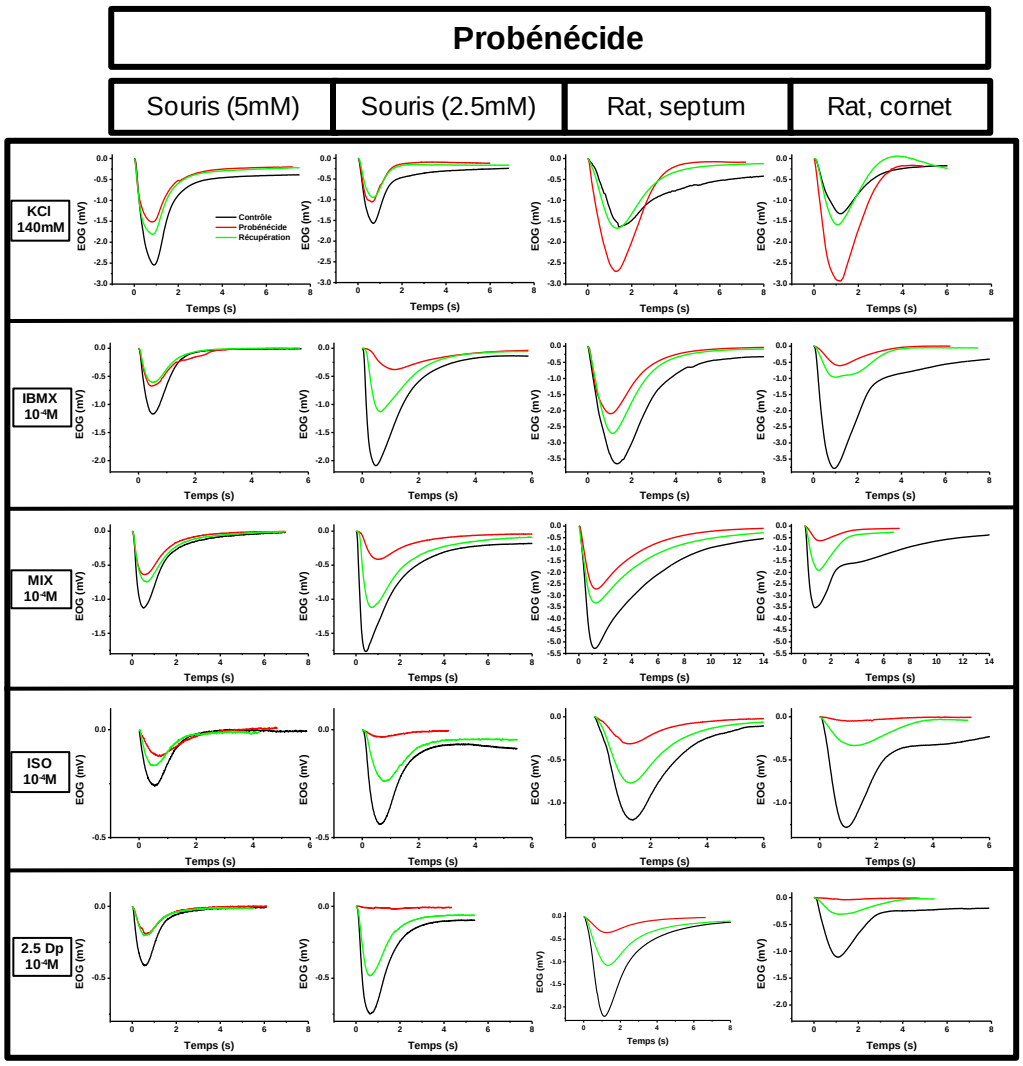


Figure 95 : Traces d'EOG obtenues sur deux septums de souris différents, un seul septum de rat et un seul cornet de rat représentatifs des réponses obtenues après différentes stimulations. Les stimulations autres que KCl ont été effectuées à 10^{-5}M et 10^{-4}M. Par soucis de lisibilité, seules les réponses aux stimulations à 10^{-4}M sont représentées. Les traces noires représentent les EOG en réponse à une stimulation dans la condition standard. Les traces rouges représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations en présence de probénécide 2,5mM et 5mM chez la souris et uniquement 2,5mM chez le rat. Les traces vertes représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations après rinçage de la préparation.

Chez la souris la moyenne des quatre amplitudes mesurées pour chaque stimulation est toujours plus faible que celle de la condition standard et ce, avec le probénécide à 2,5mM (**Figure 96**) et 5mM (**Figure 97**). Avec le probénécide à 2,5mM, seule la différence d'amplitude pour l'acétate d'isoamyle et pour le 2,5-diméthyle pyrazine à 10^{-5}M et 10^{-4}M sont significatives (**Tableau 34**). Avec le probénécide 5mM, quasiment toutes les différences sont significatives à l'exception de l'IBMX 10^{-5}M

et l'acétate d'isoamyle 10^{-5}M. La variabilité dans la condition standard va de 12,92 % pour l'acétate d'isoamyle 10^{-5}M jusqu'à 62,63 % pour le KCl (**Tableau 35**). En présence de probénécide 2,5mM, la variabilité va de 20,41 % pour le mélange 10^{-5}M à 74,01 % % pour le 2,5-diméthyle pyrazine. La condition standard pour le probénécide 5mM a une variabilité au minimum de 12,31 % pour 2,5-diméthyle pyrazine et au maximum de 68,58 % pour l'IBMX 10^{-4}M. En présence de probénécide 5mM, la variabilité des réponses va de 15,55 % pour le KCl à 87,43 % pour le 2,5-diméthyle pyrazine.

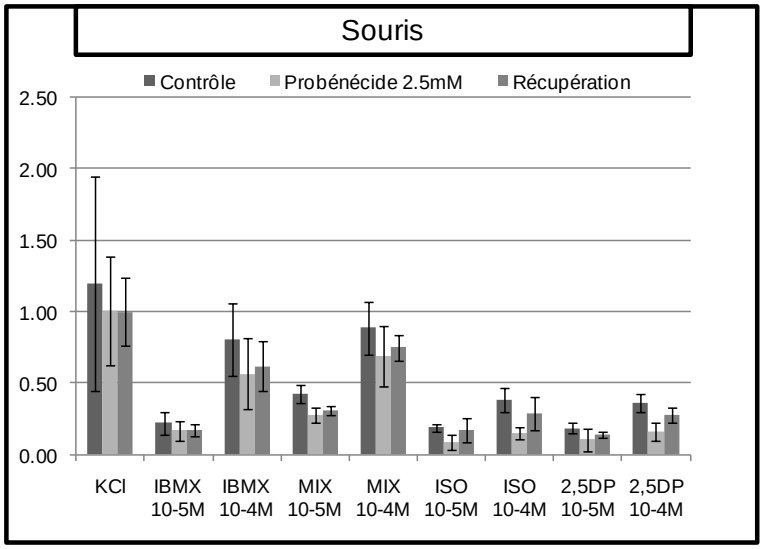


Figure 96 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations chez la souris dans la condition standard, en présence de probénécide 2,5mM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec Probénécide 2.5mM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	1.20 (±0.75)	62.63	1.01 (±0.39)	38.30	0.5815	4
IBMX 10^{-5}M	0.22 (±0.08)	34.48	0.17 (±0.07)	41.69	0.4971	4
IBMX 10^{-4}M	0.81 (±0.25)	31.37	0.56 (±0.25)	44.01	0.2543	4
MIX 10^{-5}M	0.42 (±0.07)	15.72	0.27 (±0.06)	20.41	0.0609	4
MIX 10^{-4}M	0.88 (±0.18)	20.60	0.69 (±0.21)	30.98	0.3412	4
ISO 10^{-5}M	0.19 (±0.02)	12.92	0.08 (±0.05)	59.88	0.0343	4
ISO 10^{-4}M	0.38 (±0.09)	22.70	0.15 (±0.04)	28.02	0.0140	4
2,5DP 10^{-5}M	0.18 (±0.04)	19.38	0.10 (±0.08)	74.01	0.0410	4
2,5DP 10^{-4}M	0.36 (±0.07)	18.22	0.16 (±0.06)	39.39	0.0014	4

Tableau 34 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition chez la souris. Soit dans la condition standard soit en présence de probénécide 2,5mM. La variabilité relative est obtenue suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

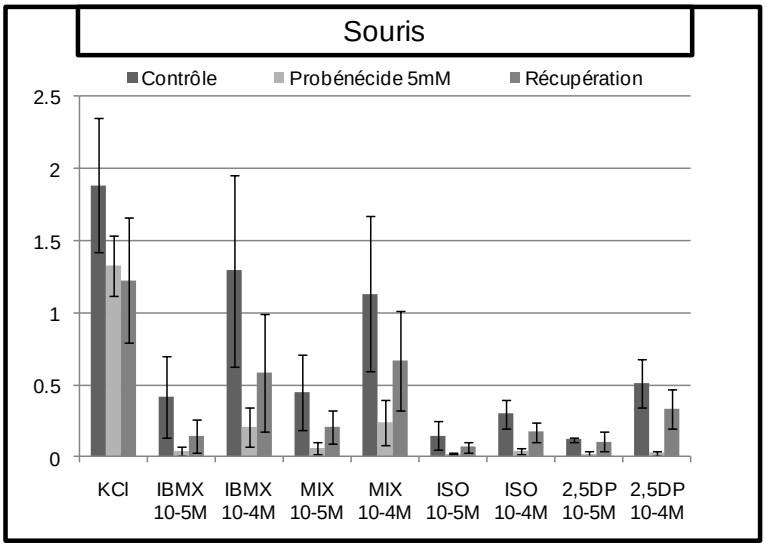


Figure 97 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations chez la souris dans la condition standard, en présence de probénécide 5mM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec Probénécide 5mM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	1.89 (±0.47)	24.92	1.33 (±0.21)	15.55	0.0461	4
IBMX 10^{-5}M	0.42 (±0.29)	68.58	0.04 (±0.04)	87.12	0.0613	4
IBMX 10^{-4}M	1.29 (±0.67)	51.44	0.21 (±0.14)	65.21	0.0266	4
MIX 10^{-5}M	0.45 (±0.26)	59.01	0.06 (±0.04)	63.19	0.0449	4
MIX 10^{-4}M	1.13 (±0.54)	47.39	0.24 (±0.16)	65.63	0.0204	4
ISO 10^{-5}M	0.15 (±0.10)	64.80	0.02 (±0.01)	39.11	0.0804	4
ISO 10^{-4}M	0.30 (±0.10)	34.27	0.04 (±0.02)	51.07	0.0145	4
2,5DP 10^{-5}M	0.12 (±0.01)	12.31	0.02 (±0.02)	87.43	0.0001	4
2,5DP 10^{-4}M	0.51 (±0.17)	33.06	0.03 (±0.01)	56.62	0.0103	4

Tableau 35 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition chez la souris. Soit dans la condition standard soit en présence de probénécide 5mM. La variabilité relative est obtenue suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

Sur le septum de rat, les EOG en réponse au KCl en présence de probénécide ont une amplitude moyenne supérieure à la condition standard tandis que toutes les autres stimulations ont une amplitude moyenne inférieure (**Figure 98**). A l'exception du KCl, toutes ces différences sont significatives. Dans la condition standard la variabilité moyenne est au minimum de 8,79 % pour l'IBMX 10^{-4}M et maximale avec 41,78 % pour l'IBMX 10^{-5}M. En présence de probénécide 2,5mM, la variabilité moyenne est minimale avec 34,76 % pour le KCl et maximale avec 86,76 % pour le 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M (**Tableau 36**).

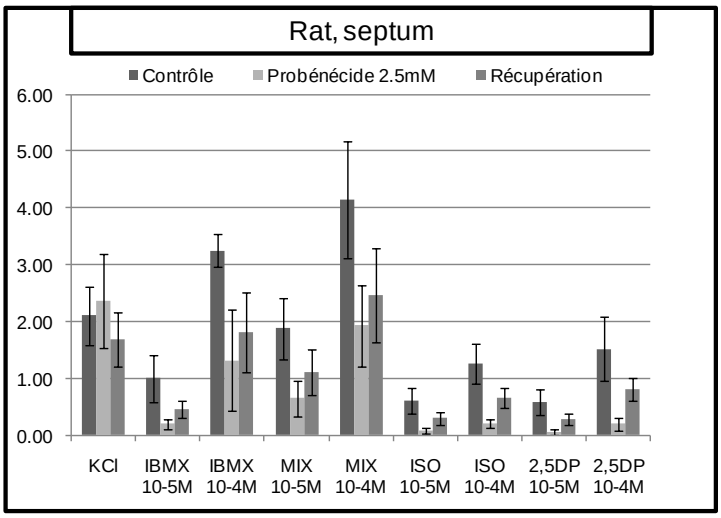


Figure 98 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations sur le septum de rat dans la condition standard, en présence de probénécide 2,5mM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec Probénécide 2.5mM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	2.10 (±0.51)	24.40	2.37 (±0.82)	34.76	0.4886	4
IBMX 10^{-5}M	1.00 (±0.42)	41.78	0.20 (±0.09)	43.32	0.0250	4
IBMX 10^{-4}M	3.25 (±0.29)	8.79	1.32 (±0.90)	68.01	0.0111	4
MIX 10^{-5}M	1.87 (±0.53)	28.43	0.64 (±0.32)	49.98	0.0113	4
MIX 10^{-4}M	4.14 (±1.03)	24.96	1.93 (±0.71)	37.02	0.0032	4
ISO 10^{-5}M	0.60 (±0.22)	37.05	0.08 (±0.05)	68.01	0.0174	4
ISO 10^{-4}M	1.26 (±0.36)	28.38	0.20 (±0.08)	37.24	0.0108	4
2,5DP 10^{-5}M	0.58 (±0.23)	39.92	0.05 (±0.05)	86.73	0.0130	4
2,5DP 10^{-4}M	1.52 (±0.57)	37.53	0.20 (±0.11)	54.98	0.0120	4

Tableau 36 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition sur le septum de rat. Soit dans la condition standard soit en présence de probénécide 2,5mM. La variabilité relative est obtenue suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

Sur le cornet de rat, les EOG en réponse au KCl en présence de probénécide ont une amplitude moyenne supérieure à celle de la condition standard tandis que les autres stimulations ont une amplitude moyenne inférieure (**Figure 99**). A l'exception du KCl et de l'IBMX 10^{-4}M, les autres stimulations subissent une diminution significative en présence de probénécide 2,5mM. La variabilité moyennes des amplitudes de la condition standard va de 21,79 % avec le 2,5-diméthyle pyrazine à 52,50 % avec l'IBMX 10^{-4}M. En présence de probénécide la variabilité moyenne va de 42,36 % avec le KCl à 127,36 % pour le 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M (**Tableau 37**).

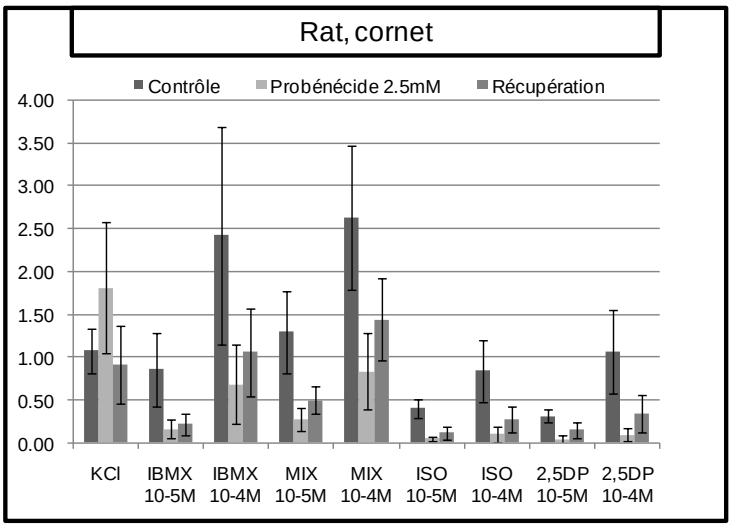
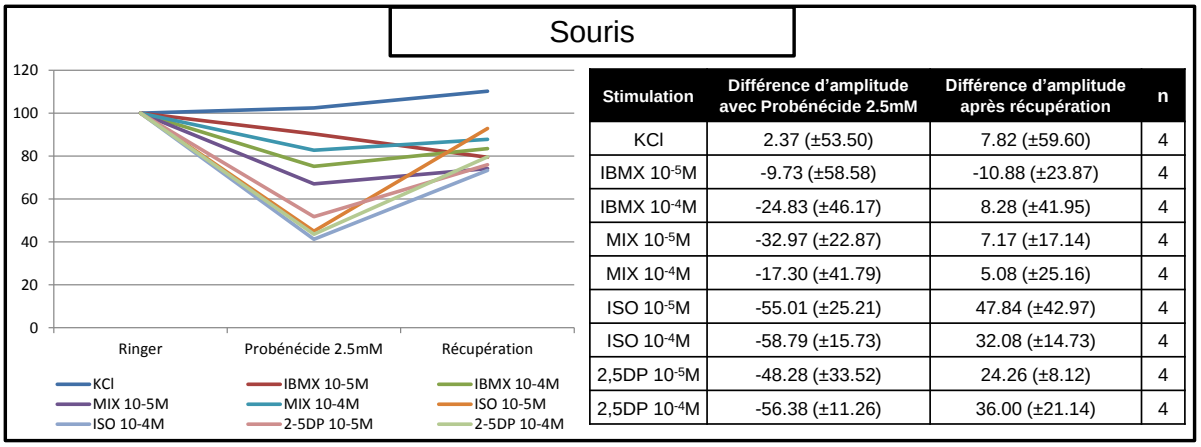


Figure 99 : Graphique en barres représentant les moyennes des amplitudes maximales en mV des EOG obtenus en réponse à plusieurs stimulations sur le septum de rat dans la condition standard, en présence de probénécide 2.5mM et après rinçage de la préparation. Les amplitudes maximales sont mesurées à partir de quatre EOG obtenus dans la même condition.

Stimulation	Moyenne des contrôles	Variabilité relative (%)	Moyenne avec Probénécide 2.5mM	Variabilité relative (%)	p	n
KCl	1.07 (±0.26)	24.12	1.81 (±0.77)	42.36	0.1190	4
IBMX 10^{-5}M	0.85 (±0.42)	49.50	0.16 (±0.11)	64.94	0.0409	4
IBMX 10^{-4}M	2.42 (±1.27)	52.50	0.68 (±0.46)	67.00	0.0772	4
MIX 10^{-5}M	1.29 (±0.48)	36.75	0.28 (±0.13)	48.14	0.0253	4
MIX 10^{-4}M	2.62 (±0.84)	31.94	0.84 (±0.45)	54.08	0.0348	4
ISO 10^{-5}M	0.40 (±0.11)	26.75	0.05 (±0.03)	58.60	0.0036	4
ISO 10^{-4}M	0.84 (±0.36)	42.70	0.10 (±0.09)	87.27	0.0246	4
2,5DP 10^{-5}M	0.32 (±0.07)	21.79	0.04 (±0.05)	127.36	0.0020	4
2,5DP 10^{-4}M	1.07 (±0.49)	45.85	0.09 (±0.08)	82.60	0.0195	4

Tableau 37 : Moyennes des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à une stimulation dans la même condition sur le cornet de rat. Soit dans la condition standard soit en présence de probénécide 2,5 mM. La variabilité relative est obtenue suivant la formule : (Ecart type/Moyenne)*100. Le test statistique est un test de Student bilatéral par paires avec un seuil de significativité fixé à $p \leq 0,05$.

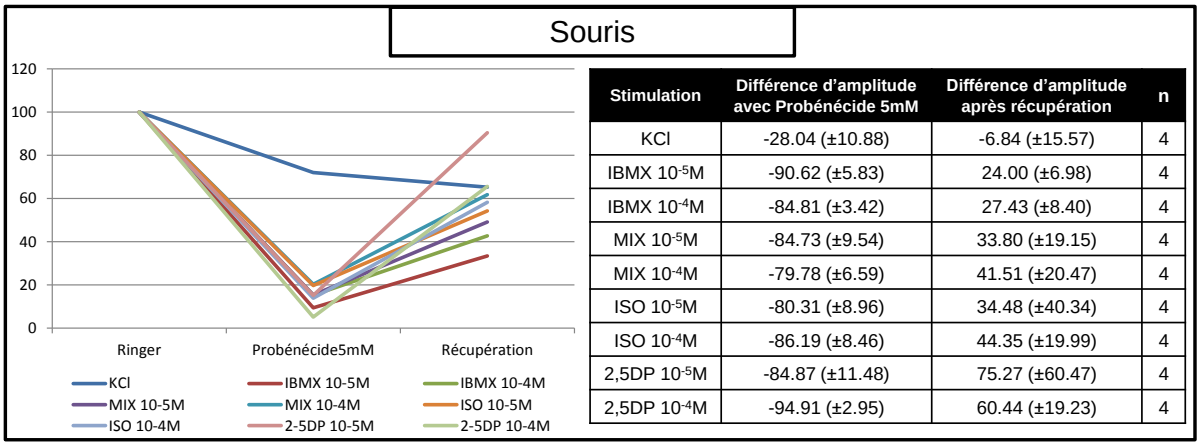
Chez la souris, le probénécide 2,5mM a un effet maximal sur l'acétate d'isoamyle 10^{-4}M avec une diminution moyenne de 58,79 % et une récupération moyenne de 32,08 %.L'effet est minimal sur l'IBMX 10^{-5}M avec une diminution moyenne de 9,73 %, suivi d'une autre diminution moyenne de 10,88 % après rinçage. Le probénécide 2,5mM provoque sur la réponse au KCl une augmentation moyenne de 2,37 % avec une autre augmentation en moyenne de 7,82 % après rinçage (**Figure 100**).



Stimulation	Différence d'amplitude avec Probénécide 2.5mM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	2.37 (±53.50)	7.82 (±59.60)	4
IBMX 10^{-5}M	-9.73 (±58.58)	-10.88 (±23.87)	4
IBMX 10^{-4}M	-24.83 (±46.17)	8.28 (±41.95)	4
MIX 10^{-5}M	-32.97 (±22.87)	7.17 (±17.14)	4
MIX 10^{-4}M	-17.30 (±41.79)	5.08 (±25.16)	4
ISO 10^{-5}M	-55.01 (±25.21)	47.84 (±42.97)	4
ISO 10^{-4}M	-58.79 (±15.73)	32.08 (±14.73)	4
2,5DP 10^{-5}M	-48.28 (±33.52)	24.26 (±8.12)	4
2,5DP 10^{-4}M	-56.38 (±11.26)	36.00 (±21.14)	4

Figure 100 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues chez la souris à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

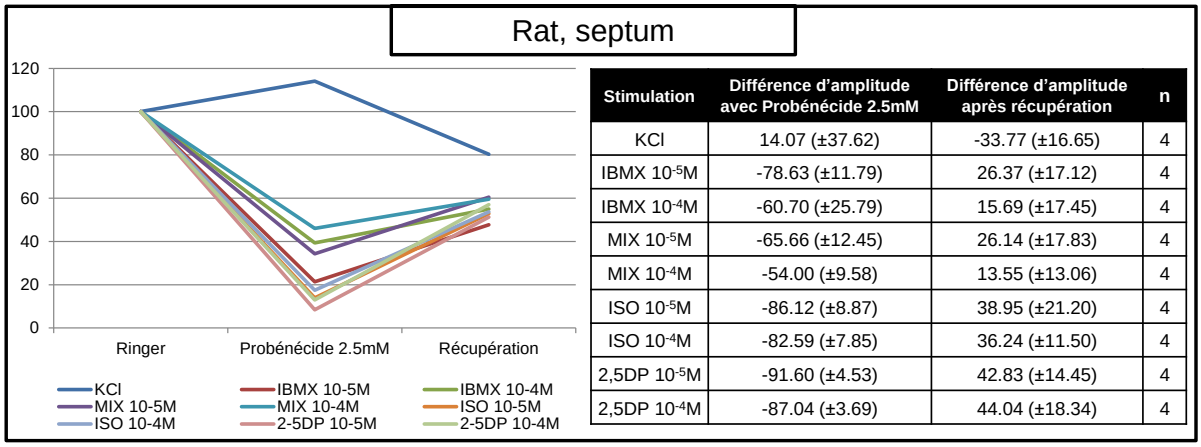
Le probénécide 5mM chez la souris a un effet maximal sur le 2,5 Diméthyle pyrazine 10-4M avec une diminution de 94,91 % et une récupération de 60,44 %. L'effet est minimal sur le KCl avec une diminution de 28,04 % et une autre diminution après rinçage de 6,84 % (**Figure 101**).



Stimulation	Différence d'amplitude avec Probénécide 5mM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	-28.04 (±10.88)	-6.84 (±15.57)	4
IBMX 10^{-5}M	-90.62 (±5.83)	24.00 (±6.98)	4
IBMX 10^{-4}M	-84.81 (±3.42)	27.43 (±8.40)	4
MIX 10^{-5}M	-84.73 (±9.54)	33.80 (±19.15)	4
MIX 10^{-4}M	-79.78 (±6.59)	41.51 (±20.47)	4
ISO 10^{-5}M	-80.31 (±8.96)	34.48 (±40.34)	4
ISO 10^{-4}M	-86.19 (±8.46)	44.35 (±19.99)	4
2,5DP 10^{-5}M	-84.87 (±11.48)	75.27 (±60.47)	4
2,5DP 10^{-4}M	-94.91 (±2.95)	60.44 (±19.23)	4

Figure 101 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues chez la souris à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

Sur le septum de rat l'effet du probénécide 2,5Mm est maximal pour 2,5-diméthyle pyrazine 10^{-5}M avec une diminution moyenne de 91,60 % et une récupération moyenne de 42,83 %. L'effet est minimal sur le mélange 10^{-4}M avec une diminution moyenne de 54 % et une récupération moyenne de 13,55 %. L'amplitude de la réponse au KCl augmente en moyenne de 14,07 % en présence de probénécide et diminue de 33,77 % après rinçage (**Figure 102**).

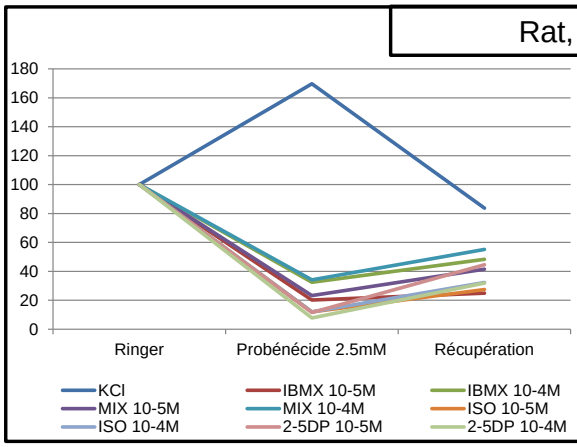


Stimulation	Différence d'amplitude avec Probénécide 2.5mM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	14.07 (±37.62)	-33.77 (±16.65)	4
IBMX 10^{-5}M	-78.63 (±11.79)	26.37 (±17.12)	4
IBMX 10^{-4}M	-60.70 (±25.79)	15.69 (±17.45)	4
MIX 10^{-5}M	-65.66 (±12.45)	26.14 (±17.83)	4
MIX 10^{-4}M	-54.00 (±9.58)	13.55 (±13.06)	4
ISO 10^{-5}M	-86.12 (±8.87)	38.95 (±21.20)	4
ISO 10^{-4}M	-82.59 (±7.85)	36.24 (±11.50)	4
2,5DP 10^{-5}M	-91.60 (±4.53)	42.83 (±14.45)	4
2,5DP 10^{-4}M	-87.04 (±3.69)	44.04 (±18.34)	4

Figure 102 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues sur le septum de rat à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

Sur le cornet de rat, le probénécide 2,5mM a un effet maximal sur le 2,5-diméthyl pyrazine 10^{-4}M avec une diminution moyenne de 92,29 % et une récupération moyenne de 24,08 %. L'effet est minimal sur le mélange 10^{-4}M avec une diminution de 65,93 % et une récupération moyenne de 21,03

%. Le probénécide 2,5mM provoque une augmentation de l'amplitude de la réponse au KCl avec une augmentation moyenne de 69,67 % et une diminution de 85,91 % après rinçage (**Figure 103**).



Stimulation	Différence d'amplitude avec Probénécide 2.5mM	Différence d'amplitude après récupération	n
KCl	69.67 (±52.64)	-85.91 (±28.91)	4
IBMX 10^{-5}M	-79.86 (±16.74)	4.76 (±14.56)	4
IBMX 10^{-4}M	-67.65 (±27.41)	15.93 (±26.50)	4
MIX 10^{-5}M	-76.75 (±13.35)	18.22 (±17.17)	4
MIX 10^{-4}M	-65.93 (±21.16)	21.03 (±11.48)	4
ISO 10^{-5}M	-88.10 (±6.53)	15.54 (±11.21)	4
ISO 10^{-4}M	-88.05 (±9.47)	20.37 (±13.04)	4
2,5DP 10^{-5}M	-88.56 (±14.42)	33.04 (±23.05)	4
2,5DP 10^{-4}M	-92.29 (±4.51)	24.08 (±8.69)	4

Figure 103 : Amplitudes moyennes des EOG normalisées sur la condition standard. Moyennes obtenues sur le cornet de rat à partir de quatre valeurs pour chaque stimulation. Amplitudes exprimées en pourcentage avec amplitude des EOG dans la condition standard égale à 100 %.

Les traces d'EOG normalisées puis moyennées pour la souris avec le probénécide 2,5mM se montrent inexploitables pour l'acétate d'isoamyle et la 2,5-diméthyle pyrazine, car l'EOG se trouve tellement réduit qu'il est difficile de le différencier du bruit. Pour l'IBMX 10^{-4}M, la cinétique de l'EOG montre une phase d'ascension plus lente que la condition standard. Pour le probénécide à 2,5mM, les EOG enregistrés chez la souris et le rat ne présentent pas de différence notable avec la condition standard (**Figure 104**).

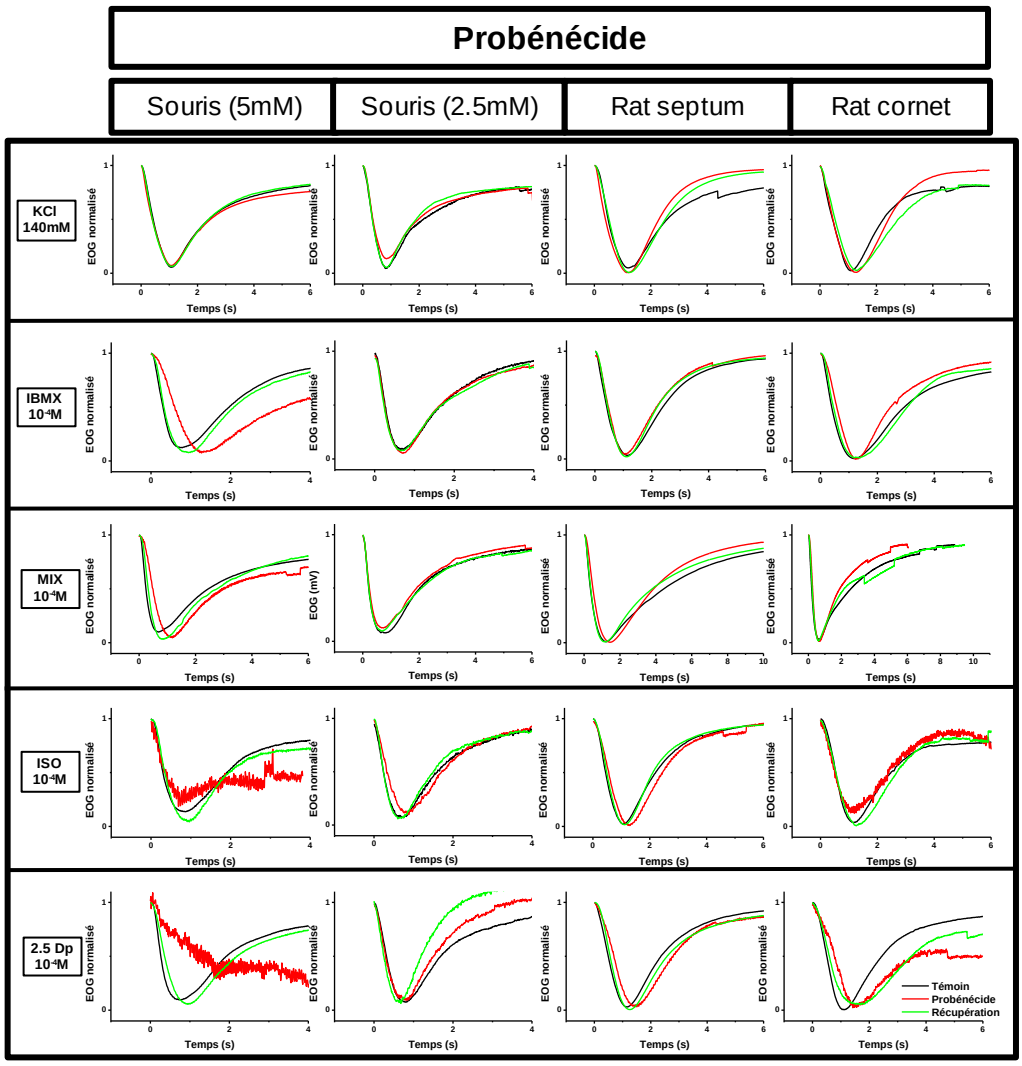


Figure 104 : Traces d'EOG normalisées et moyennées obtenues sur le septum de souris, le septum et le cornet de rat en réponse à plusieurs stimulations. Ces traces moyennes sont obtenues à partir des quatre traces obtenues dans la même condition, préalablement normalisées sur leur amplitude maximale. Les stimulations autres que KCl, ont été effectuées à 10^{-5}M et 10^{-4}M. Par soucis de lisibilité, seules les réponses aux stimulations à 10^{-4}M sont représentées. Les traces noires représentent les EOG en réponse à une stimulation dans la condition standard. Les traces rouges représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations en présence de probénécide 2,5mM et 5mM chez la souris et uniquement 2,5mM chez le rat. Les traces vertes représentent les EOG obtenus en réponse à des stimulations après rinçage de la préparation.

A l'exception de la 2,5-diméthyle pyrazine, le probénécide diminue l'amplitude des réponses de façon proportionnelle à la concentration de la stimulation. Ainsi l'évolution de l'amplitude des réponses pour une stimulation de 10^{-5}M à 10^{-4}M est identique en présence de probénécide et dans la condition standard. L'évolution de l'amplitude de la réponse en fonction de la concentration de 2,5-diméthyl pyrazine est plus faible en présence de probénécide. Le probénécide semble avoir un effet

plus important sur la réponse à la 2,5-diméthyle pyrazine lorsque l'on augmente la concentration de la stimulation (**Figure 105**).

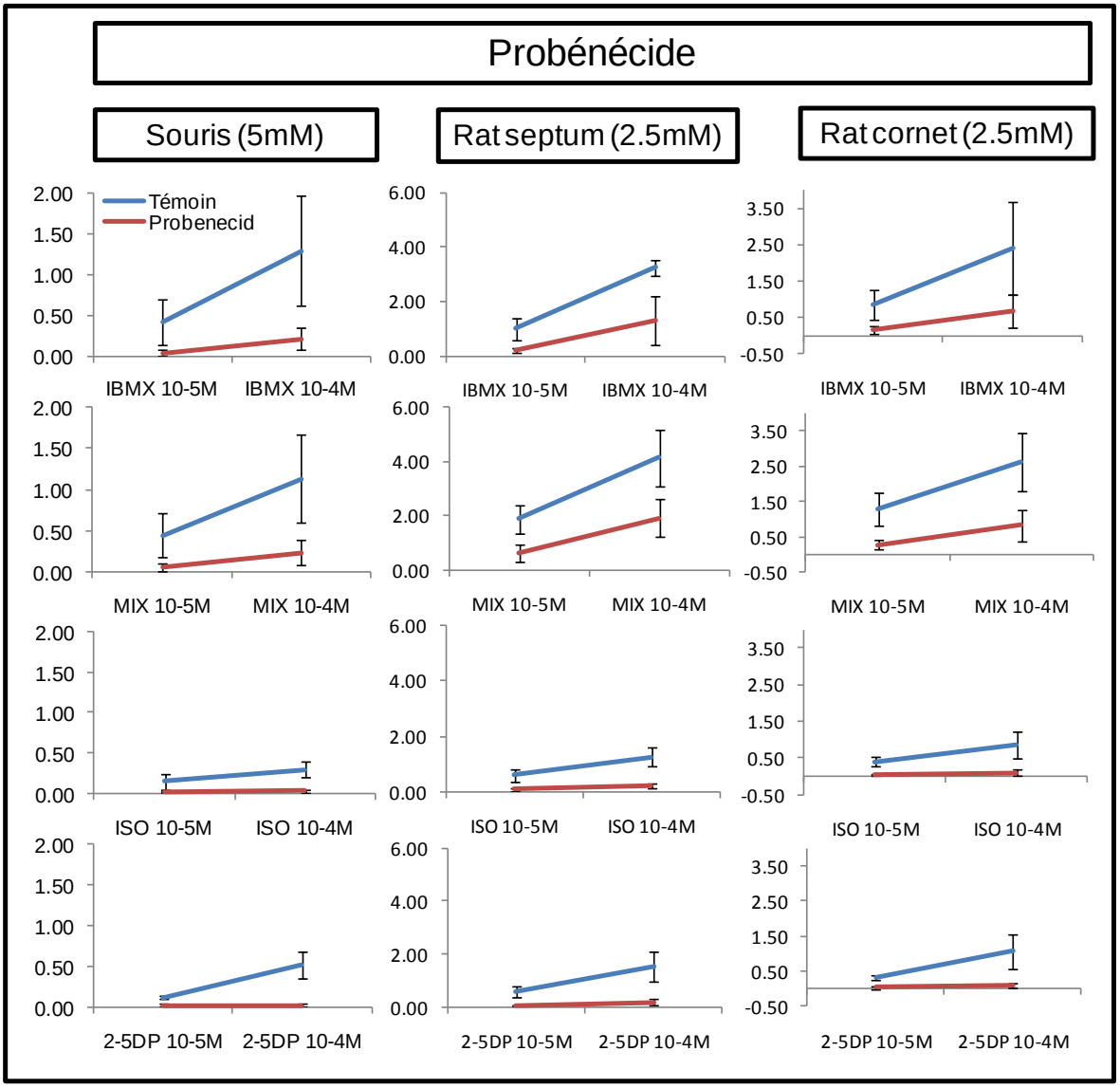


Figure 105 : Evolution de l'amplitude maximale des EOG en fonction de la concentration de la stimulation dans la condition standard comparée à la présence de probénécide 5mM pour la souris et 2,5mM pour le rat. Les valeurs sont la moyenne des amplitudes maximales mesurées à partir de quatre EOG obtenus en réponse à la même stimulation dans des conditions similaires.

e) Récapitulatif

Des quatre bloqueurs, aux concentrations testées, le MK571 a le plus grand effet, que ce soit chez la souris où il provoque une diminution de l'amplitude Vmax des EOG comprise entre 51 % et 89 %,

ou sur le septum du rat avec une diminution comprise entre 62 % et 92 % et sur le cornet de rat, avec une diminution comprise entre 51 %et 83 % (**Figure 106**).

Vient ensuite le probénécide 2,5mM qui provoque sur le septum du rat une diminution de l'amplitude maximale des EOG comprise entre 54 % et 91 % et sur le cornet, une diminution comprise entre 66 % et 92 %. Chez la souris, le probénécide 2,5mM provoque une diminution comprise entre 9 % et 58 % et comprise entre 80 % et 94 % lorsque l'on applique une concentration double(5mM).

Le vérapamil provoque une diminution de l'amplitude maximale des EOG comprise entre 8 % et 59 % chez la souris, entre 43 % et 72 % sur le septum et entre 26 % et 62 % sur le cornet du rat.

A la concentration proposée, la cyclosporine a clairement le plus petit effet sur l'amplitude maximale des EOG. Chez la souris cet effet est compris entre +8 % et -11 % par rapport à la condition standard. Il est compris entre +1 % et -45 % sur le septum et entre -2 % et -46 % sur le cornet de rat.

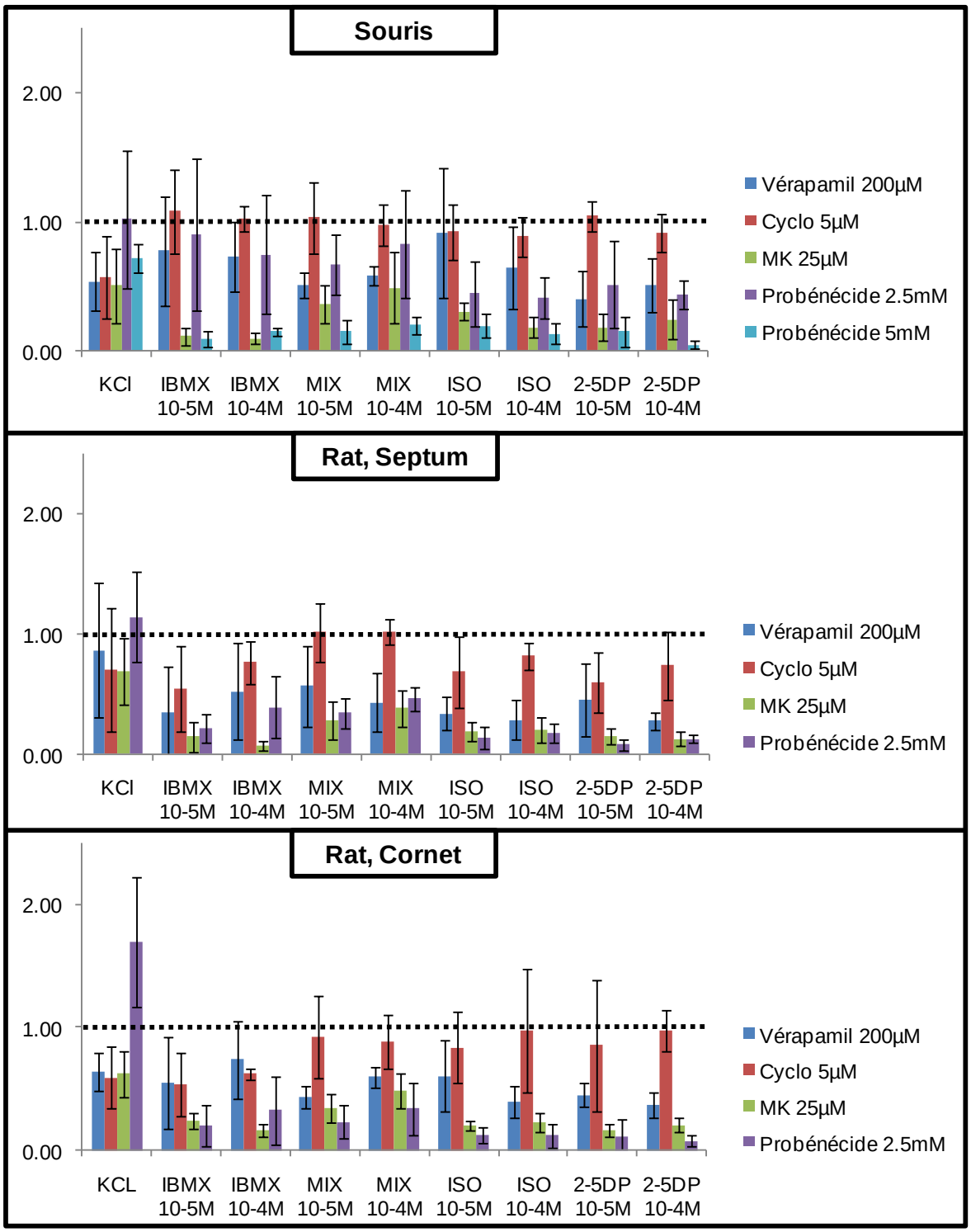


Figure 106 : Amplitudes moyennes des EOG en présence d'un bloqueur relativement à la condition standard. Les valeurs individuelles de chaque EOG en présence d'un bloqueur sont normalisées par rapport à leur condition standard respective avant d'être moyennées. Sur les diagrammes en bâtons, la valeur de la condition standard est 1, elle est représentée par un trait en pointillés. Une barre restant en dessous du trait représente une diminution de l'amplitude en présence d'un bloqueur tandis qu'une barre dépassant le trait représente une augmentation.

C. Mise en évidence par RT-PCR de l'expression de Mdr1 et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif

1. Chez la souris

Nous avons voulu mettre en évidence l'expression de Mdr1 et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif de souris.

Après extraction à partir de l'épithélium olfactif entier, d'un échantillon de foie ou d'un échantillon de rein, l'ARN messager (ARNm) est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc). Cet ADNc est amplifié par PCR. Les produits de PCR sont mis à migrer sur gel d'électrophorèse. On retrouve des bandes aux poids moléculaires attendus pour les amplicons de Mdr1a (265 paires de bases), Mdr1b (482pb) et de Mrp1 (822pb). Ces gels révèlent donc l'expression des gènes de Mdr1a, Mdr1b et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif de souris adulte (**Figure 107**) et nouveau-née (**Figure 108**). Ils confirment aussi l'expression de Mdr1a, Mdr1b et Mrp1 dans le foie de la souris adulte et nouveau-née et dans le rein de la souris adulte. La bande située à 165pb révèle l'expression de la cyclophilin A et confirme le bon fonctionnement des réactions de PCR tout comme l'absence de bande pour le contrôle négatif certifie la non contamination des réactifs utilisés.

L'épaisseur des bandes peut donner un ordre de grandeur relatif sur la quantité d'expression des différents gènes puisque les réactions de RT-PCR se sont toutes faites à partir de la même quantité d'ARN. Ainsi on remarque que l'expression de Mdr1a, Mdr1b et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif est comparable chez la souris adulte et nouveau-née.

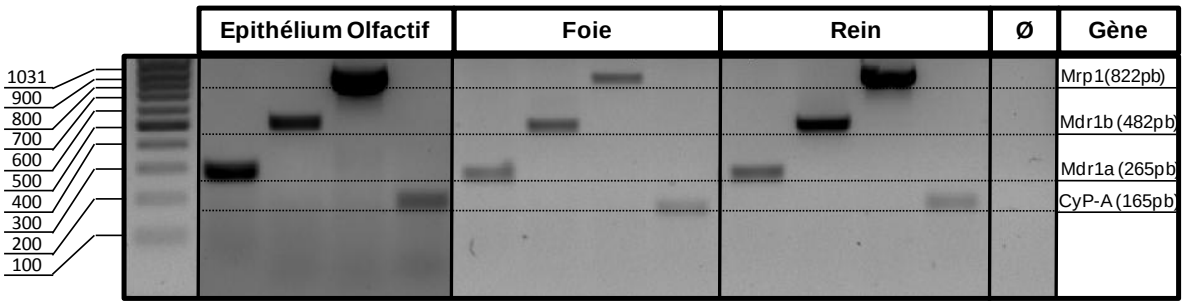


Figure 107 : Gels de migration de produits de RT-PCR effectuées à partir d'ARNm extrait de tissus de souris adulte. Montage fait à partir de deux gels réalisés simultanément dans les mêmes conditions et à partir des mêmes réactifs. Les résultats pour l'épithélium olfactif proviennent d'un premier gel tandis que les résultats pour le foie, le rein et le contrôle négatif proviennent du deuxième gel. Ø=PCR effectuée avec les amorces pour la cyclophilin A (CyP-A) et en l'absence d'échantillons.

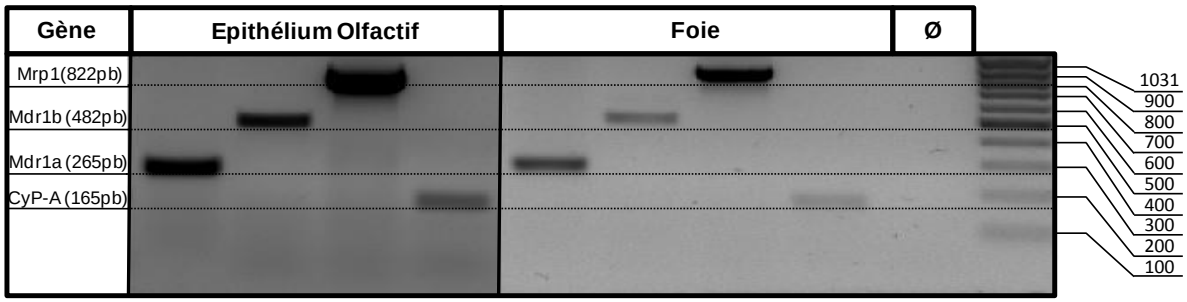


Figure 108 : Gels de migration de produits de RT-PCR réalisés à partir d'ARNm extrait de tissus de souris nouveau-née. Montage fait à partir de deux gels réalisés simultanément dans les mêmes conditions et à partir des mêmes réactifs. Les résultats pour l'épithélium olfactif proviennent d'un premier gel tandis que les résultats pour le foie et le contrôle négatif proviennent du deuxième gel. Ø=PCR effectuée avec les amorces pour la cyclophilin A (CyP-A) et en l'absence d'échantillons.

2. Chez le rat

Nous avons voulu mettre en évidence l'expression de Mdr1 et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif de rat.

Les gels obtenus après extraction d'ARN à partir de l'épithélium olfactif entier, d'un échantillon de foie ou de rein et ayant subi une RT-PCR révèlent la présence de bandes aux poids moléculaires attendus pour Mdr1a (234pb), Mdr1b (564pb) et de Mrp1 (691pb). Ces bandes révèlent l'expression de Mdr1a, Mdr1b et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif et le foie de rat adulte (**Figure 109**) et nouveau-né (**Figure 110**) ainsi que dans le rein de rat adulte. La bande située à 229pb révèle l'expression de la cyclophilin A et confirme le bon fonctionnement des réactions de PCR tout comme l'absence de bande pour le contrôle négatif certifie l'absence de contamination des réactifs utilisés.

L'épaisseur des bandes montre que Mdr1a et Mdr1b seraient plus faiblement exprimés chez le rat nouveau-né comparé à l'adulte, et ce, dans l'épithélium olfactif et le foie. Pour le foie du rat nouveau-né, la bande pour Mdr1b est à peine visible.

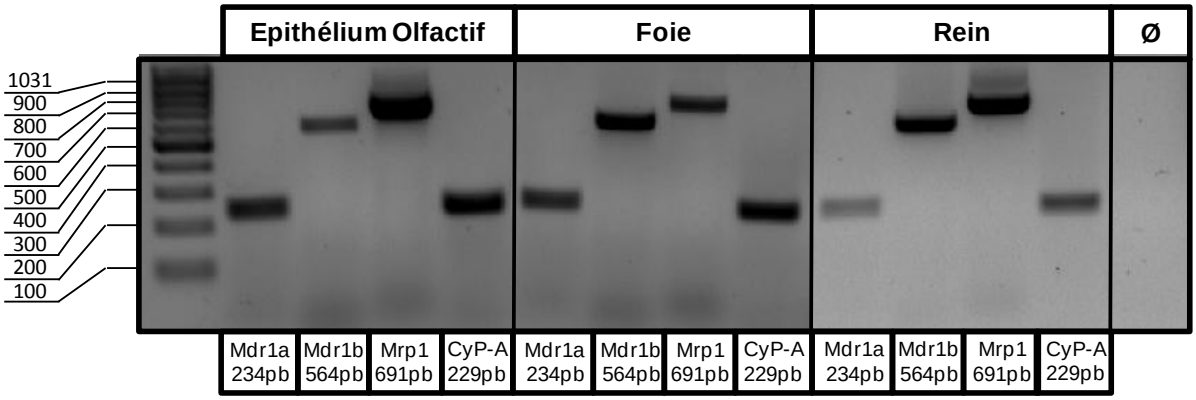


Figure 109 : Gels de migration de produits de RT-PCR effectuées à partir d'ARNm extrait de tissus de rat adulte. Montage fait à partir de deux gels réalisés simultanément dans les mêmes conditions et à partir des mêmes réactifs. Les résultats pour l'épithélium olfactif et le foie proviennent d'un premier gel tandis que les résultats pour le rein et le contrôle négatif proviennent du deuxième gel. Ø=PCR réalisée avec les amorces pour la cyclophilin A (CyP-A) et en l'absence d'échantillons.

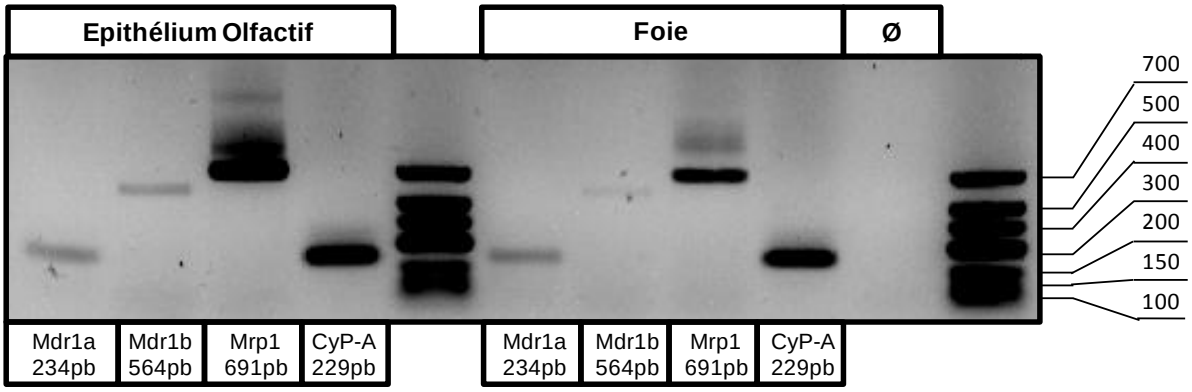


Figure 110 : Gel de migration de produits de RT-PCR réalisées à partir d'ARNm extraits de tissus de rat nouveau-né. Ø=PCR réalisée avec les amorces pour la cyclophilin A (CyP-A) et en l'absence d'échantillons.

3. RT-PCR chez la souris mutante

Nous avons voulu contrôler le génotype de nos souris mutantes et vérifier la fiabilité de notre technique d'extraction d'ARN et de RT-PCR. Nous avons donc extrait de l'ARN à partir de tissus de souris nouveau-nées mutantes. Nous avons ensuite effectué une RT-PCR à partir d'ARNm extrait

d'échantillons de foie et d'épithélium olfactif entier. Nous avons fait migrer les produits sur gel d'électrophorèse.

On retrouve des bandes aux poids moléculaires attendus pour Mdr1a et Mdr1b mais pas de bande correspondant à Mrp1. Là où on aurait dû trouver une bande à 822pb, on retrouve de très petits fragments, inférieurs à 165pb et des fragments très lourds, largement supérieurs à 1000pb. Ceci confirme la disruption du gène Mrp1 dans l'épithélium olfactif et dans le foie et valide notre technique d'extraction et de RT-PCR (**Figure 111**).

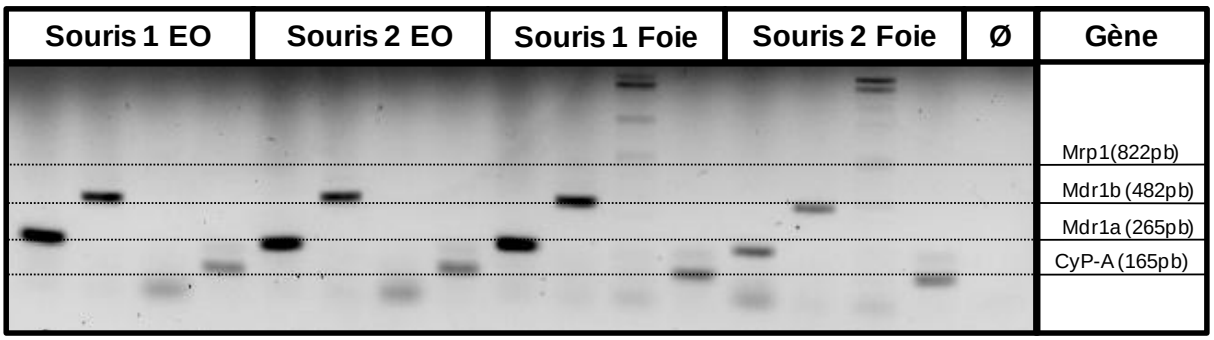


Figure 111 : Gel de migration de produits de RT-PCR effectuées à partir d'ARNm extraits de prélèvements tissulaires de deux souris mutantes nouveau-nées issues de deux portées différentes. EO=Epithélium olfactif. Ø=PCR effectuée avec les amorces pour la cyclophilin A (CyP-A) et en l'absence d'échantillons.

4. RT-PCR sur cellules dissociées de l'épithélium olfactif de rat et de souris.

Afin de déterminer précisément dans quel type cellulaire Mdr1 et Mrp1 sont exprimés nous avons voulu effectuer une RT-PCR à partir d'ARNm extraits exclusivement de neurones olfactifs. Pour cela il a fallu préalablement les identifier et les prélever.

Après rinçage du bain d'incubation des cellules dissociées en présence de fluoresceine β-D-galactopyranoside (FDG), on observe des centaines de cellules fixées sur la lamelle de verre recouverte de polyethyleneimine (PEI). Comme attendu, toutes les cellules ne sont pas fluorescentes. En moyenne, la moitié des cellules isolées restantes présentent de la fluorescence mais seulement une sur dix en moyenne présente une très forte fluorescence. Ces cellules très fluorescentes présentent la plupart du temps une dendrite terminée par sa vésicule olfactive, le tout rattaché à un corps cellulaire allongé d'une dizaine de micromètres. Cette morphologie signe sans ambigüité que ces cellules sont des neurones olfactifs. Ces neurones olfactifs ainsi identifiés sont collectés un par un et regroupés par groupe de cinq ou dix. Les autres cellules ne sont pas morphologiquement identifiables, celles ne

présentant pas de fluorescence sont récupérées une par une et également regroupées par groupe de cinq à dix (**Figure 112**, **Figure 113**).

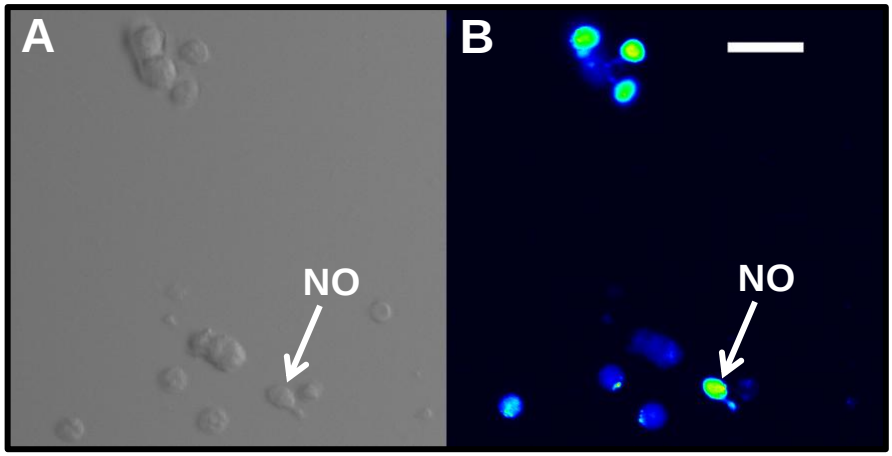


Figure 112 : Cellules dissociées de l'épithélium olfactif de rat adulte. Cellules incubées 1h à 4°C en présence de fluoresceine β-D-galactopyranoside 1mM. [A] image prise en transmission. [B] image prise en fluorescence. NO = neurone olfactif. Echelle=100 µm

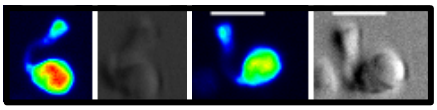


Figure 113 : Images de deux neurones olfactifs dissociés à partir de l'épithélium olfactif de rat. Cellules incubées en présence de fluoresceine β-D-galactopyranoside 1mM pendant 1h à 4°C. En couleurs, images prises en fluorescence. En niveaux de gris, images prises en transmission. Echelle=30 µm.

Nous avons voulu extraire l'ARN de ces groupes de cinq à dix cellules et l'utiliser pour une RT-PCR afin de déterminer dans quel type cellulaire étaient exprimés Mdr1a, Mdr1b et Mrp1. Pour cela nous avons utilisé les mêmes amorces que chez la souris Balb/c et le rat Wistar de lignée sauvage avec en plus une amorce pour le gène de la glutathion-S-transférase (GST). Trois échantillons ont été utilisés pour la RT-PCR. L'échantillon d'ARN provenant des neurones olfactifs, l'échantillon d'ARN provenant de cellules fluorescentes et l'échantillon de milieu ont subi une RT-PCR en présence des amorces pour Mdr1a, Mdr1b, Mrp1, CyP-A et GST. Le principe étant que la GST doit être absente de l'échantillon de neurones olfactifs et très probablement présente dans l'échantillon de cellules non fluorescentes. Aucune amplification ne doit avoir lieu dans l'échantillon provenant du milieu.

Malgré plusieurs tentatives chez le rat et la souris et malgré un soin particulier pour éviter toute contamination, les résultats des RT-PCR ont montré de l'amplification dans les échantillons contenant du milieu. Ceci invalide toute observation possible quant à la spécificité cellulaire de l'expression que

l'on aurait pu mettre en évidence. De plus, l'expression de la Cyclophilin A n'a pas toujours été constatée dans les échantillons contenant des cellules, révélant soit la limite de sensibilité de la technique de RT-PCR utilisée, soit la perte d'une partie des cellules au cours des différentes étapes de récupération.

Faute de temps, cette approche n'a pas été poursuivie mais mérite certainement un effort supplémentaire de mise au point.

Discussion

IV. Discussion

Au cours de notre travail, nous avons voulu, dans un premier temps, mettre en évidence l'activité de deux transporteurs, P-gp et Mrp1, dans l'épithélium olfactif de rat et de souris nouveau-nés. A l'aide d'un test de chargement de la calcéine-AM nous avons montré que des substances inhibitrices de ces transporteurs telles que vérapamil, cyclosporine A, probénécide et surtout MK571 augmentent l'accumulation de calcéine dans l'épithélium olfactif. Ces résultats suggèrent qu'il y a bien un phénomène de résistance *pléiotropique* induit par P-gp et Mrp1.

Dans un deuxième temps, nous avons montré en enregistrant des électro-olfactogrammes que le vérapamil, le probénécide et MK571, mais pas cyclosporine A, diminuent significativement l'amplitude des réponses aux stimulations par les substances odorantes et par l'IBMX. Ces résultats suggèrent une implication fonctionnelle de MDR1 et de MRP1 dans la sensibilité olfactive.

Dans un troisième temps, nous avons confirmé, par RT-PCR, l'expression de Mdr1a, Mdr1b et Mrp1 dans l'épithélium olfactif de rat et de souris adultes et nouveau-nés.

Dans un quatrième temps, nous avons voulu confirmer la pertinence de ces transporteurs avec des souris génétiquement modifiées. Le fait que seul MK571 augmente l'accumulation de calcéine dans l'épithélium olfactif de souris mrp1 $^{-/-}$ est un résultat inattendu qui nous pousse à évaluer la spécificité des bloqueurs choisis et l'implication possible d'autres transporteurs dans les phénomènes observés.

A. Variabilité des résultats :

1. Variabilité des ratios d'accumulation de la calcéine dans la muqueuse olfactive.

Nous avons mesuré l'évolution de l'intensité de fluorescence sur des tranches coronales de la cavité nasale de souris et de rat nouveau-nés. Nous en avons tiré un taux d'accumulation de la calcéine au cours du temps. Si on regarde ce taux d'accumulation dans les 19, 16 et 11 conditions contrôles respectivement chez le rat, la souris et la souris transgénique mrp1 $^{-/-}$, on observe une variabilité relative comprise en majeur partie entre 20 % et 50 %. Lorsque l'on effectue un ratio du taux d'incorporation en présence d'un bloqueur sur le taux d'incorporation dans sa condition contrôle, on observe une variabilité relative pour l'ensemble des enregistrements comprise entre 20 % et 60 %. La variabilité que l'on observe reste dans un l'ordre de grandeur observé dans d'autres publications. Avec une préparation semblable sur l'épithélium olfactif de Xénope, avec du fura red, I. Manzini obtient une variabilité relative comprise entre 20 % et 40 % (Manzini and Schild, 2003). La même étendue de

variabilité est observée avec une préparation en tranche de langue de rat et l'accumulation de calcéine dans les papilles gustatives par I Jakob (Jakob et al., 1998). Dans ces deux préparations, le taux d'accumulation de calcéine dans les deux conditions a pu être enregistré à partir de la même tranche, ce que nous n'avons pas pu réaliser. De ce fait, une part de variabilité peut être imputable directement à la technique utilisée même si l'on ne peut exclure d'autres sources de la variation.

D'un point de vue technique, la détermination des ROI peut être une source de variations. Les proportions de cellules basales, de cellules de soutiens, de neurones olfactifs ou de canal des glandes de Bowman qu'ils incluent, en plus de quelques lacunes tissulaires parfois, peuvent difficilement être identiques entre deux préparations. Rappelons qu'on a observé des ensembles hétérogènes de pixels activés en traçant des histogrammes de distribution. Puisqu'ils peuvent être affectés différemment par l'application des inhibiteurs, on peut penser que ces différentes populations de pixels correspondent à des types cellulaires distincts et que leurs quantités relatives et leur équipement spécifique en transporteurs peuvent influencer plus ou moins l'intensité de fluorescence moyenne du ROI.

D'un point de vue physiologique. Dans les premiers jours post-nataux, la muqueuse olfactive est encore en plein développement et l'intervalle de trois jours qui peut séparer deux animaux lors des enregistrements peut retentir sur la proportion de neurones par rapport aux cellules de soutien et sur l'épaisseur de la muqueuse (Mendoza and Kuhnel, 1991; Oikawa et al., 2001). Par ailleurs, l'expression des transporteurs peut être augmentée au cours du développement comme c'est le cas dans le cerveau entier de souris où la quantité de P-gp est quasiment multipliée par deux entre le jour de la naissance et le septième jour post-natal (Tsai et al., 2002).

2. Variabilité de l'amplitude des EOG

Dans une condition standard, on observe une certaine variabilité de l'amplitude des EOG alors que la stimulation reste identique. On observe chez le rat et la souris une variabilité relative comprise en majeure partie entre 30 % et 50 %. Cette variabilité reste dans l'ordre de grandeur observé dans des études précédentes chez le rat (thèse de Stéphanie Véloso, 2009) et chez la souris (Chen et al., 2000).

Une des sources potentielles de variabilité des réponses pourrait provenir de différences interindividuelles. La localisation et la proportion de chaque récepteur olfactif dans la muqueuse olfactive sont des paramètres qui peuvent être influencés par le patrimoine génétique et l'expérience de l'individu. D'un point de vue technique, malgré le soin apporté au placement relatif de l'électrode d'enregistrement vis-à-vis du flux de stimulation sur la préparation, il persiste une certaine différence dans la disposition de deux préparations qui peuvent, au final, influer sur la qualité de l'enregistrement. Durant notre protocole d'enregistrement, la préparation est sollicitée pendant près de

80 minutes pendant lesquelles de faibles changements de l'état de la préparation, du débit du flux aqueux ou du contact avec l'électrode peuvent aussi influencer la qualité des enregistrements. Si notre amplificateur avait pu nous le permettre, on aurait souhaité mesurer la résistance de notre circuit. On aurait eu ainsi une indication de la qualité du contact de l'électrode avec la préparation pour chaque enregistrement.

B. Expression de P-gp et de Mrp1 dans l'épithélium olfactif

1. Expression de P-gp

Par RT-PCR qualitative, nous avons mis en évidence l'expression de Mdr1a et de Mdr1b dans l'épithélium olfactif de rat adulte. Ce résultat va dans le sens des résultats de Thiebaud et col. qui ont déjà mis en évidence l'expression de ces deux isoformes chez le rat adulte par RT-PCR quantitative (Thiebaud et al., 2010). En extrayant l'ARN à partir d'une région exclusivement olfactive du septum, nous confirmons l'expression de Mdr1a et b dans l'épithélium olfactif de rat adulte. La mise en évidence de l'expression de Mdr1a et b dans le foie et le rein de rat adulte est en accord avec les études précédentes (Brady et al., 2002; Thiebaud et al., 2010).

Nous avons mis en évidence l'expression de Mdr1a et b dans l'épithélium olfactif de rat nouveau-né. A notre connaissance, ce résultat est original, puisqu' il n'existe pas de données publiées correspondantes. Nous avons également mis évidence l'expression de ces deux isoformes dans le foie. Ce résultat corrobore une étude antérieure du niveau d'expression de Mdr1a et b sur des rat Sprague Dawley âgés de -1 à 42 jours à l'aide d'une technique de RT-PCR quantitative (de Zwart et al., 2008).

Nous avons mis en évidence l'expression de Mdr1a et b dans l'épithélium olfactif de souris adulte. Ce résultat est original pour Mdr1b et conforme aux résultats de Graff et col. pour Mdr1a (Graff and Pollack, 2005). Nous avons aussi mis évidence l'expression de Mdr1a et b dans le foie et le rein de la souris adulte. Ces résultats concordent avec ceux de Cui et col. qui ont quantifié l'expression de ces deux isoformes dans différents tissus de souris C57BL/6 à l'aide d'une technique d'ADN branché (Cui et al., 2009).

Chez la souris nouveau-née, nous avons mis évidence l'expression de Mdr1a et b dans l'épithélium olfactif. Ce résultat est lui-aussi original. Nous avons également mis en évidence l'expression de Mdr1a et b dans le foie. Nous observons une différence avec les résultats de Schiengold et col. qui détectent bien, par RT-PCR, Mdr1b mais pas Mdr1a dans le foie de souris nouveau-née BALB/c (Schiengold et al., 2001). Nous avons extrait l'ARN à partir de souris nouveau-nées dans leur 5ème jour postnatal, tandis que Schiengold et col. ont travaillé sur des animaux le jour de

leur naissance. La différence d'expression pourrait donc correspondre à une variation ontogénique. Schiengold et col. ainsi que Cui et col. (2009) mettent bien en évidence l'expression de Mdr1a et b chez la souris nouveau-née de la lignée C57BL/6.

2. Expression de Mrp1

Nous avons mis en évidence l'expression de Mrp1 dans l'épithélium olfactif de rat adulte. Ces résultats concordent avec ceux d'études précédentes menées à l'aide d'une technique de RT-PCR quantitative (Kudo et al., 2010; Thiebaud et al., 2010) et d'ADN branché (Genter et al., 2010). Dans ces études, l'origine de l'épithélium olfactif dont est extrait l'ARN est soit récupéré sur les cornets, soit ce n'est pas précisé (cavité nasale). L'épithélium présent sur les cornets n'est pas exclusivement olfactif (observations personnelles) cela dit, Kudo et col. précisent par hybridation *in situ* que Mrp1 est présent uniquement dans l'épithélium olfactif. Nous mettons aussi en évidence l'expression de Mrp1 dans le foie et le rein. Ces résultats sont en accord avec les trois études citées précédemment.

Chez le rat nouveau-né nous avons mis évidence l'expression de Mrp1 dans l'épithélium olfactif. Ici encore ce résultat est original. Nous avons mis en évidence l'expression de Mrp1 dans le foie de rats nouveau-nés. Ce résultat concorde avec ceux de l'étude menée précédemment par Zwart et col. à l'aide d'une technique de RT-PCR quantitative (de Zwart et al., 2008).

Nous avons aussi mis, pour la première fois, en évidence l'expression de Mrp1 dans l'épithélium olfactif de souris adulte. Dans le même temps, nous avons mis en évidence l'expression de Mrp1 dans le foie et le rein. Ces résultats concordent avec ceux observés par Maher et col. à l'aide d'une technique d'ADN branché sur des souris adultes de lignée C57BL/6 (Maher et al., 2005).

Pour la première fois aussi, nous avons mis en évidence l'expression de Mrp1 dans l'épithélium olfactif et le foie de souris nouveau-née.

C. Activité de P-gp et de Mrp1 dans la muqueuse olfactive

1. Effets des bloqueurs de P-gp et de Mrp1 chez le rat et la souris de lignée sauvage

Que ce soit chez la souris ou le rat nouveau-né, nous avons montré que l'application de substances connues pour bloquer l'activité de P-gp (vérapamil et cyclosporine A) et de Mrp1 (probénécide et MK571) provoquent une augmentation du chargement de calcéine dans la muqueuse olfactive. En effectuant des enregistrements au cours du temps nous avons montré que l'évolution de la

fluorescence était linéaire et que les bloqueurs utilisés accéléraient la cinétique de chargement de calcéine. En appliquant les bloqueurs à deux concentrations différentes nous avons aussi montré que cet effet est dépendant de la concentration. Ainsi, le vérapamil appliqué à 200 µM multiplie en moyenne la cinétique de chargement d'un facteur 2,2(±0,6) chez le rat et 2,4(±0,1) chez la souris. La cyclosporine A appliquée à 10 µM multiplie en moyenne la cinétique de chargement d'un facteur 2,1(±0,9) chez le rat et 2,9(±1,64) chez la souris. Le probénécide appliqué à 2,5mM multiplie en moyenne la cinétique de chargement d'un facteur 2,3(±1,4) chez le rat. Appliqué à 5mM il multiplie en moyenne la cinétique de chargement d'un facteur 2,5(±0,74) chez la souris. Le MK571 appliqué à 50 µM multiplie en moyenne la cinétique de chargement d'un facteur 3,9(±2,2) chez le rat et 3,3(±1,2) chez la souris. L'accélération de la cinétique de chargement de calcéine en présence de ces bloqueurs est en accord avec les études de Jakob et col. sur les bourgeons du goût chez le rat et de Manzini et Schild sur l'épithélium olfactif chez le têtard de Xénope (Jakob et al., 1998; Manzini and Schild, 2003).

L'intensité de fluorescence de calcéine accumulée dans le milieu intracellulaire n'est pas influencée par le pH ni par la présence d'ions calcium ou magnésium (Homolya et al., 1993; Lebedeva et al., 2011). On sait aussi que l'activité des estérases qui hydrolysent calcéine-AM en calcéine n'est pas influencée par la présence de vérapamil ou de cyclosporine A chez le rat (Jakob et al., 1998). Plusieurs études mettent en évidence une modulation de l'accumulation de calcéine dans divers tissus ou lignées cellulaires en présence de vérapamil (Jakob et al., 1998; Manzini and Schild, 2003), cyclosporine A (Jakob et al., 1998; Legrand et al., 1998; Liminga et al., 1994), probénécide (Dogan et al., 2004; Fujita et al., 1997; Jakob et al., 1998; Legrand et al., 1998; Manzini and Schild, 2003) ou MK571 (Dogan et al., 2004; Manzini and Schild, 2003; Manzini et al., 2008) et mettent en corrélation cet effet avec la présence de P-gp et/ou de Mrp1 soit par *western blot* ou soit par immunohistochimie. Les bloqueurs que nous avons utilisés semblent donc bien spécifiques soit de P-gp soit de Mrp1, en tout cas dans des conditions physiologiques. En effet, il a été montré que des cellules rendues résistantes par pression sélective peuvent présenter un polymorphisme pour P-gp. Ces variations de P-gp peuvent avoir pour conséquence un changement de spécificité pour leur substrat et une sensibilité altérée pour les inhibiteurs (Pauli-Magnus and Kroetz, 2004).

2. Effets des bloqueurs de P-gp et de Mrp1 chez la souris transgénique mrp1$^{-/-}$

Vérapamil, cyclosporine A et probénécide ne présentent aucun effet sur l'accumulation de calcéine par la muqueuse olfactive. En présence de MK571 par contre, il y a une multiplication significative de la cinétique d'accumulation en moyenne d'un facteur 3,3 (±1,2). Ce résultat a priori

est étonnant. D'une part, aucun bloqueur de P-gp n'a d'effet alors que par RT-PCR nous avons mis en évidence son expression dans l'épithélium olfactif. D'autre part, nous avons utilisé une lignée de souris transgénique avec le gène pour Mrp1 inactivé. Par RT-PCR qualitative, nous avons confirmé l'absence d'expression de mrp1 dans l'épithélium olfactif et mis en évidence l'expression de Mdr1a et b.

Il faut prendre en compte le fait que ces souris transgéniques sont issues d'une lignée FVB contrairement aux souris de lignée sauvage que nous avons utilisées précédemment qui sont issues d'une lignée BALB/c. Il existe de nombreuses différences entre les lignées de souris notamment au niveau de l'expression de divers comportements, tout comme une certaine variabilité de leur sensibilité à différentes drogues (Crawley et al., 1997). A l'origine de ces variations phénotypiques, il y a une différence génétique et une variation des interactions entre ces gènes. On pourrait donc penser que P-gp est bien exprimée dans l'épithélium olfactif de ces souris transgéniques mais à un niveau trop faible pour que l'on puisse détecter une variation de l'accumulation de calcéine en présence de bloqueur.

Le fait que MK571 ait un effet sur un tissu dépourvu de Mrp1 porte à croire que cet inhibiteur n'est pas spécifique de Mrp1 et que d'autres transporteurs fonctionnels sont capables d'évacuer la calcéine dans l'épithélium olfactif. Il a été montré que, chez ces souris transgéniques adultes, mrp2 et mrp5 sont plus exprimés dans le foie en comparaison avec la lignée sauvage alors que les expressions de mdr1a et de mrp3 ne sont pas affectées (Bain and Feldman, 2003).Les gènes mrp1, mrp3, mrp4 et mrp5 sont exprimés dans la cavité nasale de rat adulte avec mrp4 exprimé trois fois plus que mrp1 (Genter et al., 2010; Thiebaud et al., 2010). Le gène mrp2 par contre n'est pas exprimé dans la cavité nasale (Kudo et al., 2010). MK571 pourrait donc bloquer Mrp3 qui a le plus d'homologie avec Mrp1. Il pourrait également bloquer Mrp4 qui est régulé positivement en l'absence de Mrp1 probablement par compensation, ce qui pourrait traduire une fonction physiologique relativement proche des deux transporteurs.

3. Localisation cellulaire de l'activité de P-gp et de Mrp1

Dans notre article nous avons mis en évidence que le chargement de calcéine dans des cellules identifiées comme des neurones et des cellules de soutien présente le même profil que le chargement dans l'ensemble de la muqueuse olfactive. Il apparaît donc que P-gp et Mrp1 semblent actifs dans les neurones olfactifs et les cellules de soutien. Nous avons cherché à confirmer l'expression de P-gp et de Mrp1 dans les neurones olfactifs par RT-PCR sur cellule unique mais nous n'avons pas abouti.

D. Diminution de l'amplitude des réponses olfactives en présence des bloqueurs de P-gp et de Mrp1.

Nous avons montré précédemment que P-gp et Mrp1 sont actifs dans la muqueuse olfactive de rat et de souris nouveau-né grâce à un test fonctionnel à la calcéine-AM. Ce résultat aurait une retombée pratique intéressante pour améliorer le marquage fluorescent de la préparation. C'est l'emploi qui en est fait par Manzini et col. ainsi que par Breunig et col. pour améliorer le chargement de fura2-AM dans l'épithélium et le bulbe olfactif de têtard de Xénope grâce au MK571 (Breunig et al., 2010; Manzini et al., 2008). L'épithélium olfactif a principalement un rôle sensitif, il a pour fonction la détection des odorants. Nous avons donc voulu savoir si les bloqueurs de P-gp et de Mrp1 utilisés précédemment pouvaient avoir une influence sur la réponse aux odorants. Pour cela nous avons utilisé la mesure d'électro-olfactogramme en phase aqueuse tout à fait adaptée pour rendre compte d'une altération de la réponse olfactive chez la souris et le rat adulte. Celle-ci permet en effet d'enregistrer des réponses aux odorants à partir d'une préparation d'épithélium entier dans des conditions proches de l'état physiologique. Les réponses recueillies représentent la sommation des potentiels générateurs de la population de neurones olfactifs présents dans le champ d'enregistrement d'une électrode posée à la surface de l'épithélium. Dans ces conditions, les neurones enregistrés sont intacts et entourés des cellules de soutien.

Vérapamil et cyclosporine A, deux substances utilisées comme bloqueurs de P-gp n'ont pas le même effet sur les EOG. Le vérapamil provoque jusqu'à 72 % de diminution de l'amplitude des EOG en réponse à un stimulus odorant tandis que la cyclosporine A n'a aucune influence sur la réponse olfactive. Dans les 18 conditions testées (3 stimulations odorantes, chacune à deux concentrations, appliquées sur trois préparations distinctes), le vérapamil provoque une diminution de l'amplitude des réponses aux odorants, dans 11 conditions sur 18 et cet effet est significatif.

Nous avons montré précédemment que l'application de vérapamil et cyclosporine A provoquent une augmentation de l'accumulation de calcéine dans la muqueuse olfactive et plus précisément dans les neurones et les cellules de soutien (voir notre article en annexe). La cyclosporine, après le MK571, a un des effets les plus marqués parmi les bloqueurs que nous avons testés. Il est étonnant de voir que celle-ci n'a pas d'effet sur la réponse olfactive contrairement au vérapamil.

Le vérapamil est un bloqueur de canaux calciques de type L dépendant du voltage (Tytgat et al., 1988). Chez la grenouille, Winegar et col. montrent une inhibition des EOG en présence de vérapamil dépendante de la concentration (Winegar et al., 1988). Cette inhibition atteint 36 % en présence de vérapamil à 150 µM. Chez le rat, des canaux calciques de type L sont exprimés par les neurones

olfactifs, ils sont localisés aussi bien au niveau de la vésicule olfactive que du dendrite et du soma (Gautam et al., 2007) mais sont absents des cils là où s'effectue la transduction du signal olfactif (Leinders-Zufall et al., 1997). Par imagerie calcique, Gautman et col. montrent que le blocage de ce canal avec la nifédipine provoque une diminution de 22 % de l'amplitude de la réponse olfactive dans la vésicule olfactive chez le rat (Gautam et al., 2006). Ils montrent aussi que ce canal n'est pas impliqué dans la génération du potentiel générateur mais plutôt dans la propagation de celui-ci de la vésicule olfactive vers le soma. Si on prend en compte le fait que la cyclosporine A n'a aucun effet significatif sur la réponse olfactive, on peut penser que l'effet de vérapamil est uniquement dû au blocage des canaux calciques dépendants du potentiel.

Comme nous l'avons montré de façon fonctionnelle, P-gp semble bien exprimée dans les cellules de soutien et les neurones olfactifs. Nous n'avons pas mis en évidence d'effet de cette protéine sur la réponse olfactive. Sur le neurone olfactif, la P-gp pourrait donc soit être exprimée loin des cils, soit n'interagit avec aucun des éléments de la transduction du signal olfactif.

Le probénécide et le MK571, deux substances utilisées comme bloqueurs de Mrp1, provoquent une diminution de l'amplitude des EOG en réponse à des odorants jusqu'à 95 % pour le probénécide et jusqu'à 92 % pour le MK571. L'effet du probénécide est dépendant de la concentration. Si on compte les deux concentrations de probénécide utilisées chez la souris, l'effet de celui-ci est significatif dans 21 des 24 conditions testées. L'effet du MK571 est significatif dans les 18 conditions testées.

1. Comment expliquer la diminution de l'amplitude des EOG en présence des bloqueurs de P-gp et de Mrp1 ?

P-gp a plus d'affinité pour les substrats lipophiles tandis que Mrp1 transporte plutôt des substances hydrophiles. Nous avons donc stimulé notre préparation avec un odorant hydrophile, le 2,5-diméthyl pyrazine et un odorant lipophile, l'acétate d'isoamyle. Nous n'avons pas observé de différence dans l'effet des bloqueurs de P-gp et de Mrp1 entre la réponse au 2,5-diméthyl pyrazine et à l'acétate d'isoamyle. De plus, nous avons effectué un test à la calcéine en présence du mélange d'odorants (résultat non présenté). L'accumulation de calcéine n'est pas influencée par la présence du mélange. Il semblerait donc que les odorants n'entrent pas en compétition avec calcéine et ne semblent donc pas être des substrats de P-gp et de Mrp1.

L'application d'une forte concentration de potassium dans le milieu extracellulaire provoque une dépolarisation des cellules de soutien et des neurones olfactifs. Les bloqueurs utilisés ont tendance à

diminuer l'amplitude de cette dépolarisation. Le MK571 a presque un effet *significatif* chez la souris (p=0,052) et chez le rat sur le cornet (p=0,053).

L'IBMX inhibe l'activité des phosphodiestérases qui inactivent l'AMPc. Il en résulte une accumulation d'AMPc dans le milieu intracellulaire. La réponse à l'IBMX empreinte la même voie de transduction que les molécules odorantes en court-circuitant l'étape de liaison au récepteur et l'activation de la protéine G. Les bloqueurs utilisés ont tendance à diminuer l'amplitude des réponses à l'IBMX. Cet effet est significatif en présence de probénécide et de MK571.

Les bloqueurs utilisés diminuent fortement l'amplitude des réponses aux odorants et l'amplitude des réponses à l'IBMX. Bien que l'amplitude soit affectée, la cinétique ne semble pas modifiée. Il semblerait donc que les bloqueurs utilisés puissent avoir une influence sur une ou plusieurs étapes de la transduction du signal olfactif. Comme les réponses à l'IBMX sont affectées, la fixation des odorants au récepteur, l'activation de la protéine G et la synthèse d'AMPc ne sont pas mises en cause.

L'AMPc est présent en permanence dans le cytosol des neurones olfactifs. La concentration d'AMPc augmente lorsque l'adénylate cyclase est activée soit par la protéine G couplée au récepteur olfactif soit en présence de forskoline. La concentration de l'AMPc cyclique intracellulaire peut aussi être augmentée en inhibant sa dégradation par les phosphodiestérases, notamment en présence d'IBMX. A une certaine concentration l'AMPc active un canal CNG qui va provoquer un influx d'ions calcium. Ces ions calcium vont à leur tour activer un canal qui va transporter des ions chlorures vers le milieu extracellulaire, amplifiant de ce fait la dépolarisation du neurone olfactif.

Si on exclut les étapes concernant les molécules odorantes et le récepteur olfactif, l'amplitude de la réponse olfactive peut dépendre de la concentration intracellulaire d'AMPc ou de l'homéostasie des ions Ca^{2+} et Cl^{-} dans le mucus et le cytosol. Ainsi une forte concentration de calcium extracellulaire désensibilise le canal CNG pour l'AMPc tandis qu'une faible concentration augmente l'amplitude des réponses olfactives (Kleene, 1999).

Au niveau intracellulaire le calcium joue un rôle important dans l'amplitude des réponses olfactives. En plus d'amplifier la dépolarisation du neurone olfactif par une entrée d'ions chlore, il est impliqué dans un rétrocontrôle négatif à l'origine de la terminaison de la réponse olfactive. Le calcium va se lier à la calmoduline, ce complexe va diminuer la sensibilité du CNG pour l'AMPc. Le complexe Calcium-calmoduline va inhiber l'activité de l'adénylate cyclase, il va également activer une calmoduline kinase qui va à son tour activer une phosphodiestérase à l'origine de la dégradation de l'AMPc. Le calcium va activer un canal qui va rejeter des ions K^{+}, le calcium va également être rejeté

via un échangeur Na^+-Ca^{2+}, cela va entraîner la fermeture du canal chlore et permettre la repolarisation du neurone.

2. P-gp et Mrp1 peuvent-ils avoir une influence sur la transduction du signal olfactif ?

MRP1, MRP4, MRP5 et MRP8 peuvent transporter des nucléotides cycliques telles que l'AMPc et la GMPc (Biondi et al., 2010; Guo et al., 2003; Wielinga et al., 2003). Mrp1, Mrp4 et Mrp5 sont bien exprimées dans la cavité nasale du rat (Genter et al., 2010; Thiebaud et al., 2010). Sur une lignée cellulaire de trophoblaste, il a été montré que MRP1 peut transporter l'AMPc. L'application de probénécide et de MK571 provoquent une diminution d'AMPc dans le milieu extracellulaire mais pas d'accumulation dans le milieu intracellulaire (Biondi et al., 2010). Sur une lignée de cellules V79 exprimant de façon hétérologue MRP5, il a été montré que le probénécide inhibe le transport d'AMPc et de GMPc contrairement à MK571 qui n'a aucun effet (Jedlitschky et al., 2000). Il a été montré sur des cellules humaines leucémiques que le probénécide et MK571 bloquent l'efflux d'AMPc par MRP4, ce qui provoque une accumulation de celle-ci dans le milieu intracellulaire (Copsel et al., 2011). A priori, le blocage de l'efflux de l'AMPc devrait avoir un effet amplificateur sur la réponse olfactive puisque celle-ci est directement dépendante de la concentration d'AMPc intracellulaire (Kleene, 2008).

L'ATP peut moduler la sensibilité des neurones olfactifs. Hegg et col. ont mis en évidence l'expression des récepteurs purinergiques $P2Y_2$ sur le dendrite, le soma ainsi que les récepteurs $P2X_1$ et $P2X_4$ au niveau du soma et de l'axone des neurones olfactifs de souris adultes en culture (Hegg et al., 2003). Sur les cellules de soutien seul $P2Y_2$ est exprimé. Le récepteur P2Y activé par l'ATP déclenche une cascade de transduction impliquant l'IP_3 qui aboutit à un influx de calcium en provenance des stocks intracellulaires. Le récepteur P2X activé par l'ATP provoque une entrée de calcium à partir du milieu extracellulaire. Hegg et col. ont montré que l'ATP inhibe la réponse calcique aux odorants du neurone olfactif. Ils obtiennent également une inhibition de la réponse calcique en présence d'agonistes de P2Y et de P2X. A l'inverse, l'amplitude de la réponse aux odorants est augmentée en présence d'antagonistes de P2Y et P2X. Ces antagonistes appliqués seuls ne provoquent pas d'entrée de calcium mais abaissent le niveau basal de calcium dans le milieu intracellulaire. L'ATP peut donc moduler l'homéostasie du calcium, ce qui a une influence directe sur la transduction du signal olfactif.

P-gp et Mrp1 peuvent-ils être impliqués dans le transport d'ATP ? Roman et col. ont montré sur des lignées cellulaires hépatiques saines ou rendues résistantes et présentant une surexpression de P-gp

que le transport d'ATP en réponse à un gonflement de la cellule pouvait être inhibé en présence de vérapamil et de cyclosporine A. Cet efflux d'ATP reste tout de même distinct de la fonction de pompe de P-gp (Roman et al., 1997; Roman et al., 2001). Il a été également montré que le transport d'ATP pouvait impliquer un transporteur Mrp, à priori Mrp1, sur des cellules issues du Taenia coli de cobaye (Zhao et al., 2010). L'efflux d'ATP induit par l'application de bradykinine dans ces cellules est inhibé en présence de MK571. La présence de Mrp1 est confirmée par *western blot*. Cet efflux d'ATP peut également être inhibé par la présence d'antagonistes des canaux chlore dépendants du calcium. Un lien entre ces canaux et Mrp reste à préciser.

Il est difficile de faire le lien avec nos résultats. Si nous bloquons P-gp et Mrp1 dans l'épithélium olfactif et que ceux-ci sont impliqués dans l'extraction d'ATP, il devrait s'en suivre une raréfaction de cette molécule dans le milieu extracellulaire. D'après Hegg et col., l'absence d'ATP, ou l'application d'antagonistes des récepteurs purinergiques potentialise la réponse olfactive. Lorsque nous appliquons des bloqueurs de Mrp nous observons l'inverse.

Dans l'état actuel de nos connaissances nous n'avons pas trouvé d'explication aux effets du blocage de Mrp sur l'amplitude des réponses olfactives. Des expériences supplémentaires sont nécessaires.

Ces résultats soulèvent plusieurs questions quant à la fonction de ces transporteurs dans l'épithélium olfactif. On peut se demander dans quelle situation l'animal dans son environnement naturel pourrait être confronté à une inhibition des transporteurs de la résistance pléiotropique et quelle signification aurait pour lui la diminution d'amplitude des réponses olfactives qui en découlerait.

Ces transporteurs exprimés et fonctionnels dans l'épithélium olfactif sembleraient, comme dans la plupart des muqueuses de l'organisme, avoir principalement un rôle dans la protection de l'organisme. L'épithélium olfactif est en contact direct avec le milieu extérieur comme les branchies chez la moule et le bivalve. Il a été montré chez ces derniers que des substances chimiques de la famille des musc cétones présentes dans leur environnement direct, milieu aquatique pollué, sont des inhibiteurs des transporteurs de xénobiotiques tels que P-gp (Luckenbach and Epel, 2005; Epel et al., 2008). Les animaux ainsi exposés présentent dans leurs tissus une forte accumulation de produits toxiques. Le blocage des transporteurs de la résistance pléiotropique potentialise donc l'absorption de substances toxiques issues du milieu extérieur qui peuvent ainsi pénétrer dans l'organisme via les branchies ou l'épithélium olfactif.

L'épithélium olfactif donne un accès direct vers le système nerveux central et peut être envisagé comme voie d'administration pour certaines substances pharmacologiques. A l'instar de la barrière hémato-encéphalique, P-gp et Mrp1 sont fonctionnels dans l'épithélium olfactif de rat et de souris. En 2005, Kandimalla et Donovan chez le bovin ainsi que Graff et Pollack chez la souris ont montré l'implication de P-gp dans le rôle de barrière pharmacologique de l'épithélium olfactif (Graff and Pollack, 2003; Kandimalla and Donovan, 2005a, b). On peut donc suggérer que l'épithélium olfactif de rat et de souris jouent un rôle de barrière pharmacologique qui impliquerait P-gp et Mrp1.

La résistance pléiotropique des barrières pharmacologiques de l'organisme d'une part et des cellules cibles d'autre part est un obstacle à l'administration de traitement anticancéreux. Dans ces traitements sont alors utilisés des inhibiteurs de P-gp et de Mrp1. Certains patients suivant ces traitements relatent une diminution de sensibilité olfactive (Bernhardson et al., 2009). A la lumière de notre étude, il serait intéressant de chercher à savoir si cette perte de sensibilité peut être relative au blocage de P-gp et de Mrp1 chez les patients humains.

Conclusion

V. Conclusion

Les protéines P-gp et Mrp1, de la famille ABC, sont des transporteurs avec un large spectre de substrats. Elles confèrent le phénotype de résistance pléiotropique aux cellules qui les expriment. Elles sont exprimées de façon intrinsèque dans de nombreux tissus. En particulier des tissus impliqués dans des fonctions de protection de l'organisme et de barrière pharmacologique. Il est avéré que l'épithélium olfactif remplit ces deux fonctions en plus de sa fonction sensorielle.

Par RT-PCR nous avons confirmé l'expression de Mrp1 et des deux isoformes de P-gp, Mdr1a et Mdr1b dans l'épithélium olfactif de rat adulte. Nous avons montré que ces protéines sont également exprimées dans l'épithélium olfactif de rat nouveau-né dès les cinq premiers jours post-nataux. De la même façon, nous avons montré que ces trois protéines sont exprimées dans l'épithélium olfactif de souris adulte et nouveau-née. Seule P-gp avait jusque-là été mise en évidence dans l'épithélium olfactif de souris adulte.

Ces transporteurs ne sont pas seulement exprimés dans l'épithélium olfactif, ils sont aussi fonctionnels. Pour le démontrer nous avons étudié le transport de calcéine-AM qui est un substrat de P-gp et de Mrp1 sur des tranches d'épithélium olfactif, préparation considérée comme physiologique. Grâce à deux bloqueurs relativement spécifiques pour chaque transporteur, nous avons montré que P-gp et Mrp1 y sont actifs. Les résultats de notre étude sur l'accumulation de calcéine dans le milieu intracellulaire ainsi que les données présentées dans la littérature nous portent à croire que P-gp et Mrp1 sont exprimés et actifs dans les neurones olfactifs et les cellules de soutien, chez le rat et la souris nouveau-nés.

Grâce à la même approche sur des souris transgéniques mrp1$^{-/-}$, nous pensons que d'autres transporteurs peuvent être actifs dans l'épithélium olfactif, en particulier Mrp4.

A l'aide d'enregistrements d'électro-olfactogrammes, nous avons montré que la P-gp ne semble pas avoir d'influence sur la réponse olfactive, tandis que Mrp1 ou Mrp4 provoquent lorsqu'elles sont bloquées, une diminution de l'amplitude mais pas de variation de la cinétique des réponses olfactives. Le ou les mécanismes qui lient ces transporteurs à la réponse olfactive restent à élucider.

Le blocage des transporteurs de la résistance pléiotropique est un bon moyen pour améliorer le marquage fluorescent de tissus dans le cadre d'études histologiques ou de tri de populations cellulaires. La détermination du couple sonde/bloqueur est un point important. Dans le cadre d'études fonctionnelles par imagerie calcique en temps réel, pour l'épithélium olfactif comme pour tout autre

tissu, il semble important aussi d'évaluer au préalable les interférences potentielles du blocage de ces transporteurs sur la fonction étudiée.

Références bibliographiques

VI. Références bibliographiques

Altman, J., Das, G.D., 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. J Comp Neurol. 124**,** 319-35.

Audinat, E., Lambolez, B., Rossier, J., 1996. Functional and molecular analysis of glutamate-gated channels by patch-clamp and RT-PCR at the single cell level. Neurochem Int. 28**,** 119-36.

Bain, L.J., Feldman, R.A., 2003. Altered expression of sulfotransferases, glucuronosyltransferases and mrp transporters in FVB/mrp1-/- mice. Xenobiotica. 33**,** 1173-83.

Bakos, E., Homolya, L., 2007. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). Pflugers Arch. 453**,** 621-41.

Bang, S., Kim, K.Y., Yoo, S., Lee, S.H., Hwang, S.W., 2007. Transient receptor potential V2 expressed in sensory neurons is activated by probenecid. Neurosci Lett. 425**,** 120-5.

Biedler, J.L., Riehm, H., 1970. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. Cancer Res. 30**,** 1174-84.

Billig, G.M., Pal, B., Fidzinski, P., Jentsch, T.J., 2011. Ca2+-activated Cl- currents are dispensable for olfaction. Nat Neurosci. 14**,** 763-9.

Biondi, C., Ferretti, M.E., Lunghi, L., Medici, S., Cervellati, F., Pavan, B., Vesce, F., Morano, D., Adinolfi, E., Bertoni, F., Abelli, L., 2010. cAMP efflux from human trophoblast cell lines: a role for multidrug resistance protein (MRP)1 transporter. Mol Hum Reprod. 16**,** 481-91.

Brady, J.M., Cherrington, N.J., Hartley, D.P., Buist, S.C., Li, N., Klaassen, C.D., 2002. Tissue distribution and chemical induction of multiple drug resistance genes in rats. Drug Metab Dispos. 30**,** 838-44.

Brechbuhl, J., Klaey, M., Broillet, M.C., 2008. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. Science. 321**,** 1092-5.

Breunig, E., Manzini, I., Piscitelli, F., Gutermann, B., Di Marzo, V., Schild, D., Czesnik, D., 2010. The endocannabinoid 2-arachidonoyl-glycerol controls odor sensitivity in larvae of Xenopus laevis. J Neurosci. 30**,** 8965-73.

Bronshtein, A.A., Minor, A.V., 1977. [Regeneration of olfactory flagella and restoration of the electroolfactogram following application of triton X-100 to the olfactory mucosa of frogs]. Tsitologiia. 19**,** 33-9.

Buck, L., Axel, R., 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell. 65**,** 175-87.

Caggiano, M., Kauer, J.S., Hunter, D.D., 1994. Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. Neuron. 13**,** 339-52.

Canitrot, Y., Lautier, D., 1995. [Use of rhodamine 123 for the detection of multidrug resistance]. Bull Cancer. 82**,** 687-97.

Chen, S., Lane, A.P., Bock, R., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., 2000. Blocking adenylyl cyclase inhibits olfactory generator currents induced by "IP(3)-odors". J Neurophysiol. 84**,** 575-80.

Chen, Y., Simon, S.M., 2000. In situ biochemical demonstration that P-glycoprotein is a drug efflux pump with broad specificity. J Cell Biol. 148**,** 863-70.

Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M., Deeley, R.G., 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science. 258**,** 1650-4.

Copsel, S., Garcia, C., Diez, F., Vermeulem, M., Baldi, A., Bianciotti, L.G., Russel, F.G., Shayo, C., Davio, C., 2011. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation. J Biol Chem. 286**,** 6979-88.

Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J.L., Melamed, M.R., Bertino, J.R., 1989. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proc Natl Acad Sci U S A. 86**,** 695-8.

Crawley, J.N., Belknap, J.K., Collins, A., Crabbe, J.C., Frankel, W., Henderson, N., Hitzemann, R.J., Maxson, S.C., Miner, L.L., Silva, A.J., Wehner, J.M., Wynshaw-Boris, A., Paylor, R., 1997. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. Psychopharmacology (Berl). 132**,** 107-24.

Cui, Y.J., Cheng, X., Weaver, Y.M., Klaassen, C.D., 2009. Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice. Drug Metab Dispos. 37**,** 203-10.

Cygnar, K.D., Zhao, H., 2009. Phosphodiesterase 1C is dispensable for rapid response termination of olfactory sensory neurons. Nat Neurosci. 12**,** 454-62.

Dahl, A.R., Hadley, W.M., 1991. Nasal cavity enzymes involved in xenobiotic metabolism: effects on the toxicity of inhalants. Crit Rev Toxicol. 21**,** 345-72.

Daval, G., Leveteau, J., MacLeod, P., 1970. [Local electroolfactogram and olfactory discrimination in frogs]. J Physiol (Paris). 62**,** 477-88.

de Castro, F., 2009. Wiring Olfaction: The Cellular and Molecular Mechanisms that Guide the Development of Synaptic Connections from the Nose to the Cortex. Front Neurosci. 3**,** 52.

de Zwart, L., Scholten, M., Monbaliu, J.G., Annaert, P.P., Van Houdt, J.M., Van den Wyngaert, I., De Schaepdrijver, L.M., Bailey, G.P., Coogan, T.P., Coussement, W.C., Mannens, G.S., 2008. The ontogeny of drug metabolizing enzymes and transporters in the rat. Reprod Toxicol. 26**,** 220-30.

Deeley, R.G., Westlake, C., Cole, S.P., 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. Physiol Rev. 86**,** 849-99.

Di Virgilio, F., Steinberg, T.H., Silverstein, S.C., 1990. Inhibition of Fura-2 sequestration and secretion with organic anion transport blockers. Cell Calcium. 11**,** 57-62.

Dixon, A.K., Richardson, P.J., Pinnock, R.D., Lee, K., 2000. Gene-expression analysis at the single-cell level. Trends Pharmacol Sci. 21**,** 65-70.

Dogan, A.L., Legrand, O., Faussat, A.M., Perrot, J.Y., Marie, J.P., 2004. Evaluation and comparison of MRP1 activity with three fluorescent dyes and three modulators in leukemic cell lines. Leuk Res. 28**,** 619-22.

Duchamp-Viret, P., Duchamp, A., Chaput, M.A., 2003. Single olfactory sensory neurons simultaneously integrate the components of an odour mixture. Eur J Neurosci. 18**,** 2690-6.

Eberwine, J., Yeh, H., Miyashiro, K., Cao, Y., Nair, S., Finnell, R., Zettel, M., Coleman, P., 1992. Analysis of gene expression in single live neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 89**,** 3010-4.

Elsaesser, R., Montani, G., Tirindelli, R., Paysan, J., 2005. Phosphatidyl-inositide signalling proteins in a novel class of sensory cells in the mammalian olfactory epithelium. Eur J Neurosci. 21**,** 2692-700.

Epel, D., Luckenbach, T., Stevenson, C.N., Macmanus-Spencer, L.A., Hamdoun, A., Smital, T., 2008. Efflux transporters: newly appreciated roles in protection against pollutants. Environ Sci Technol. 42**,** 3914-20.

Essodaigui, M., Broxterman, H.J., Garnier-Suillerot, A., 1998. Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethylester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. Biochemistry. 37**,** 2243-50.

Evers, R., Zaman, G.J., van Deemter, L., Jansen, H., Calafat, J., Oomen, L.C., Oude Elferink, R.P., Borst, P., Schinkel, A.H., 1996. Basolateral localization and export activity of the human multidrug resistance-associated protein in polarized pig kidney cells. J Clin Invest. 97**,** 1211-8.

Falcao, A.S., Bellarosa, C., Fernandes, A., Brito, M.A., Silva, R.F., Tiribelli, C., Brites, D., 2007. Role of multidrug resistance-associated protein 1 expression in the in vitro susceptibility of rat nerve cell to unconjugated bilirubin. Neuroscience. 144**,** 878-88.

Feller, N., Broxterman, H.J., Wahrer, D.C., Pinedo, H.M., 1995a. ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. FEBS Lett. 368**,** 385-8.

Feller, N., Kuiper, C.M., Lankelma, J., Ruhdal, J.K., Scheper, R.J., Pinedo, H.M., Broxterman, H.J., 1995b. Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry. Br J Cancer. 72**,** 543-9.

Ferte, J., 2000. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. Eur J Biochem. 267**,** 277-94.

Firestein, S., Werblin, F., 1989. Odor-induced membrane currents in vertebrate-olfactory receptor neurons. Science. 244**,** 79-82.

Firestein, S., 2001. How the olfactory system makes sense of scents. Nature. 413**,** 211-8.

Flens, M.J., Zaman, G.J., van der Valk, P., Izquierdo, M.A., Schroeijers, A.B., Scheffer, G.L., van der Groep, P., de Haas, M., Meijer, C.J., Scheper, R.J., 1996. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol. 148**,** 1237-47.

Fujita, T., Yamada, H., Fukuzumi, M., Nishimaki, A., Yamamoto, A., Muranishi, S., 1997. Calcein is excreted from the intestinal mucosal cell membrane by the active transport system. Life Sci. 60**,** 307-13.

Fukuda, N., Shirasu, M., Sato, K., Ebisui, E., Touhara, K., Mikoshiba, K., 2008. Decreased olfactory mucus secretion and nasal abnormality in mice lacking type 2 and type 3 IP3 receptors. Eur J Neurosci. 27**,** 2665-75.

Gautam, S.H., Otsuguro, K., Ito, S., Saito, T., Habara, Y., 2006. Intensity of odorant stimulation affects mode of Ca2+ dynamics in rat olfactory receptor neurons. Neurosci Res. 55**,** 410-20.

Gautam, S.H., Otsuguro, K.I., Ito, S., Saito, T., Habara, Y., 2007. T-type Ca2+ channels mediate propagation of odor-induced Ca2+ transients in rat olfactory receptor neurons. Neuroscience. 144**,** 702-13.

Gekeler, V., Ise, W., Sanders, K.H., Ulrich, W.R., Beck, J., 1995. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. Biochem Biophys Res Commun. 208**,** 345-52.

Genter, M.B., Krishan, M., Augustine, L.M., Cherrington, N.J., 2010. Drug transporter expression and localization in rat nasal respiratory and olfactory mucosa and olfactory bulb. Drug Metab Dispos. 38**,** 1644-7.

Gesteland, R.C., Lettvin, J.Y., Pitts, W.H., 1965. Chemical transmission in the nose of the frog. J Physiol. 181**,** 525-59.

Gillet, J.P., Efferth, T., Remacle, J., 2007. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. Biochim Biophys Acta. 1775**,** 237-62.

Gottesman, M.M., Pastan, I., 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. Annu Rev Biochem. 62**,** 385-427.

Gould, E., McEwen, B.S., 1993. Neuronal birth and death. Curr Opin Neurobiol. 3**,** 676-82.

Graff, C.L., Pollack, G.M., 2005. Functional evidence for P-glycoprotein at the nose-brain barrier. Pharm Res. 22**,** 86-93.

Graziadei, P.P., Graziadei, G.A., 1979. 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**,** 1-18.

Greene, T.A., Alarcon, S., Thomas, A., Berdougo, E., Doranz, B.J., Breslin, P.A., Rucker, J.B., Probenecid inhibits the human bitter taste receptor TAS2R16 and suppresses bitter perception of salicin. PLoS One. 6**,** e20123.

Grosmaitre, X., Fuss, S.H., Lee, A.C., Adipietro, K.A., Matsunami, H., Mombaerts, P., Ma, M., 2009. SR1, a mouse odorant receptor with an unusually broad response profile. J Neurosci. 29**,** 14545-52.

Grubb, B.R., Rogers, T.D., Kulaga, H.M., Burns, K.A., Wonsetler, R.L., Reed, R.R., Ostrowski, L.E., 2007. Olfactory epithelia exhibit progressive functional and morphological defects in CF mice. Am J Physiol Cell Physiol. 293**,** C574-83.

Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z.S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M.G., Kruh, G.D., 2003. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a

resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. J Biol Chem. 278, 29509-14.
Harker, W.G., Sikic, B.I., 1985. Multidrug (pleiotropic) resistance in doxorubicin-selected variants of the human sarcoma cell line MES-SA. Cancer Res. 45, 4091-6.
Hegg, C.C., Greenwood, D., Huang, W., Han, P., Lucero, M.T., 2003. Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. J Neurosci. 23, 8291-301.
Heydel, J.M., Holsztynska, E.J., Legendre, A., Thiebaud, N., Artur, Y., Le Bon, A.M., 2010. UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: expression, regulation, and function. Drug Metab Rev. 42, 74-97.
Hirrlinger, J., Konig, J., Dringen, R., 2002. Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. J Neurochem. 82, 716-9.
Hollo, Z., Homolya, L., Davis, C.W., Sarkadi, B., 1994. Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. Biochim Biophys Acta. 1191, 384-8.
Homolya, L., Hollo, Z., Germann, U.A., Pastan, I., Gottesman, M.M., Sarkadi, B., 1993. Fluorescent cellular indicators are extruded by the multidrug resistance protein. J Biol Chem. 268, 21493-6.
Homolya, L., Hollo, M., Muller, M., Mechetner, E.B., Sarkadi, B., 1996. A new method for a quantitative assessment of P-glycoprotein-related multidrug resistance in tumour cells. Br J Cancer. 73, 849-55.
Huque, T., Bruch, R.C., 1986. Odorant- and guanine nucleotide-stimulated phosphoinositide turnover in olfactory cilia. Biochem Biophys Res Commun. 137, 36-42.
Ishimaru, T., Tsukatani, T., Miwa, T., Furukawa, M., 2000. Zinc modulates the electro-olfactogram of the frog. Auris Nasus Larynx. 27, 257-60.
Jakob, I., Hauser, I.A., Thevenod, F., Lindemann, B., 1998. MDR1 in taste buds of rat vallate papilla: functional, immunohistochemical, and biochemical evidence. Am J Physiol. 274, C182-91.
Jedlitschky, G., Burchell, B., Keppler, D., 2000. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. J Biol Chem. 275, 30069-74.
Johnstone, R.W., Ruefli, A.A., Smyth, M.J., 2000. Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? Trends Biochem Sci. 25, 1-6.
Jourdan, F., 1975. [Ultrastructure of the olfactory epithelium of the rat: polymorphism of the receptors]. C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D. 280, 443-6.
Juliano, R.L., Ling, V., 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta. 455, 152-62.
Kandimalla, K.K., Donovan, M.D., 2005a. Localization and differential activity of P-glycoprotein in the bovine olfactory and nasal respiratory mucosae. Pharm Res. 22, 1121-8.
Kandimalla, K.K., Donovan, M.D., 2005b. Carrier mediated transport of chlorpheniramine and chlorcyclizine across bovine olfactory mucosa: implications on nose-to-brain transport. J Pharm Sci. 94, 613-24.
Karssen, A.M., Meijer, O., Pons, D., De Kloet, E.R., 2004. Localization of mRNA expression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier and in the hippocampus. Ann N Y Acad Sci. 1032, 308-11.
Kato, A., Touhara, K., 2009. Mammalian olfactory receptors: pharmacology, G protein coupling and desensitization. Cell Mol Life Sci. 66, 3743-53.
Kleene, S.J., 1999. Both external and internal calcium reduce the sensitivity of the olfactory cyclic-nucleotide-gated channel to CAMP. J Neurophysiol. 81, 2675-82.
Kleene, S.J., 2008. The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. Chem Senses. 33, 839-59.
Kudo, H., Doi, Y., Fujimoto, S., 2010. Expressions of the multidrug resistance-related proteins in the rat olfactory epithelium: a possible role in the phase III xenobiotic metabolizing function. Neurosci Lett. 468, 98-101.

Kwan, P., Sills, G.J., Butler, E., Gant, T.W., Brodie, M.J., 2003. Differential expression of multidrug resistance genes in naive rat brain. Neurosci Lett. 339**,** 33-6.

Lebedeva, I.V., Pande, P., Patton, W.F., 2011. Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. PLoS One. 6**,** e22429.

Legrand, O., Simonin, G., Perrot, J.Y., Zittoun, R., Marie, J.P., 1998. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. Blood. 91**,** 4480-8.

Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Cole, S.P., Deeley, R.G., Keppler, D., 1994a. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. J Biol Chem. 269**,** 27807-10.

Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Keppler, D., 1994b. Characterization of the ATP-dependent leukotriene C4 export carrier in mastocytoma cells. Eur J Biochem. 220**,** 599-606.

Leinders-Zufall, T., Rand, M.N., Shepherd, G.M., Greer, C.A., Zufall, F., 1997. Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. J Neurosci. 17**,** 4136-48.

Leinders-Zufall, T., Cockerham, R.E., Michalakis, S., Biel, M., Garbers, D.L., Reed, R.R., Zufall, F., Munger, S.D., 2007. Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 104**,** 14507-12.

Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicol Appl Pharmacol. 204**,** 216-37.

Li, Q., Kato, Y., Sai, Y., Imai, T., Tsuji, A., 2005. Multidrug resistance-associated protein 1 functions as an efflux pump of xenobiotics in the skin. Pharm Res. 22**,** 842-6.

Liberles, S.D., Buck, L.B., 2006. A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. Nature. 442**,** 645-50.

Liminga, G., Nygren, P., Larsson, R., 1994. Microfluorometric evaluation of calcein acetoxymethyl ester as a probe for P-glycoprotein-mediated resistance: effects of cyclosporin A and its nonimmunosuppressive analogue SDZ PSC 833. Exp Cell Res. 212**,** 291-6.

Litman, T., Zeuthen, T., Skovsgaard, T., Stein, W.D., 1997. Competitive, non-competitive and cooperative interactions between substrates of P-glycoprotein as measured by its ATPase activity. Biochim Biophys Acta. 1361**,** 169-76.

Lu, D.C., Zhang, H., Zador, Z., Verkman, A.S., 2008. Impaired olfaction in mice lacking aquaporin-4 water channels. FASEB J. 22**,** 3216-23.

Luders, A.K., Saborowski, R., Bickmeyer, U., 2009. Inhibition of multidrug/xenobiotic resistance transporter by MK571 improves dye (Fura 2) accumulation in crustacean tissues from lobster, shrimp, and isopod. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 150**,** 368-71.

Ma, M., Chen, W.R., Shepherd, G.M., 1999. Electrophysiological characterization of rat and mouse olfactory receptor neurons from an intact epithelial preparation. J Neurosci Methods. 92**,** 31-40.

Ma, M., Shepherd, G.M., 2000. Functional mosaic organization of mouse olfactory receptor neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 97**,** 12869-74.

Ma, M., Grosmaitre, X., Iwema, C.L., Baker, H., Greer, C.A., Shepherd, G.M., 2003. Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. J Neurosci. 23**,** 317-24.

Mackay-Sim, A., Kesteven, S., 1994. Topographic patterns of responsiveness to odorants in the rat olfactory epithelium. J Neurophysiol. 71**,** 150-60.

Maher, J.M., Cheng, X., Slitt, A.L., Dieter, M.Z., Klaassen, C.D., 2005. Induction of the multidrug resistance-associated protein family of transporters by chemical activators of receptor-mediated pathways in mouse liver. Drug Metab Dispos. 33**,** 956-62.

Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L.B., 1999. Combinatorial receptor codes for odors. Cell. 96**,** 713-23.

Mamasuew, K., Hofmann, N., Breer, H., Fleischer, J., 2011. Grueneberg ganglion neurons are activated by a defined set of odorants. Chem Senses. 36**,** 271-82.

Manzini, I., Schild, D., 2003. Multidrug resistance transporters in the olfactory receptor neurons of Xenopus laevis tadpoles. J Physiol. 546**,** 375-85.
Manzini, I., Schweer, T.S., Schild, D., 2008. Improved fluorescent (calcium indicator) dye uptake in brain slices by blocking multidrug resistance transporters. J Neurosci Methods. 167**,** 140-7.
Matthews, H.R., Reisert, J., 2003. Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation. Curr Opin Neurobiol. 13**,** 469-75.
Maue, R.A., Dionne, V.E., 1987. Patch-clamp studies of isolated mouse olfactory receptor neurons. J Gen Physiol. 90**,** 95-125.
Mayer, U., Kuller, A., Daiber, P.C., Neudorf, I., Warnken, U., Schnolzer, M., Frings, S., Mohrlen, F., 2009. The proteome of rat olfactory sensory cilia. Proteomics. 9**,** 322-34.
Mendoza, A.S., Kuhnel, W., 1991. Postnatal changes in the ultrastructure of the rat olfactory epithelium: the supranuclear region of the supporting cells. Cell Tissue Res. 265**,** 193-6.
Merritt, J.E., McCarthy, S.A., Davies, M.P., Moores, K.E., 1990. Use of fluo-3 to measure cytosolic Ca2+ in platelets and neutrophils. Loading cells with the dye, calibration of traces, measurements in the presence of plasma, and buffering of cytosolic Ca2+. Biochem J. 269**,** 513-9.
Messler, P., Harz, H., Uhl, R., 1996. Instrumentation for multiwavelengths excitation imaging. J Neurosci Methods. 69**,** 137-47.
Michalakis, S., Reisert, J., Geiger, H., Wetzel, C., Zong, X., Bradley, J., Spehr, M., Huttl, S., Gerstner, A., Pfeifer, A., Hatt, H., Yau, K.W., Biel, M., 2006. Loss of CNGB1 protein leads to olfactory dysfunction and subciliary cyclic nucleotide-gated channel trapping. J Biol Chem. 281**,** 35156-66.
Mirski, S.E., Gerlach, J.H., Cole, S.P., 1987. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. Cancer Res. 47**,** 2594-8.
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**,** 675-86.
Mori, K., Nagao, H., Yoshihara, Y., 1999. The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. Science. 286**,** 711-5.
Motulsky, H., 2010. Intuitive Biostatistics, Vol., Oxford University Press, USA.
Mucignat-Caretta, C., 2010. The rodent accessory olfactory system. J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol. 196**,** 767-77.
Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt 1**,** 263-73.
Munger, S.D., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., 2009. Subsystem organization of the mammalian sense of smell. Annu Rev Physiol. 71**,** 115-40.
Nef, P., Heldman, J., Lazard, D., Margalit, T., Jaye, M., Hanukoglu, I., Lancet, D., 1989. Olfactory-specific cytochrome P-450. cDNA cloning of a novel neuroepithelial enzyme possibly involved in chemoreception. J Biol Chem. 264**,** 6780-5.
Negishi, M., Pedersen, L.G., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y., Pedersen, L.C., 2001. Structure and function of sulfotransferases. Arch Biochem Biophys. 390**,** 149-57.
Neyfakh, A.A., 1988. Use of fluorescent dyes as molecular probes for the study of multidrug resistance. Exp Cell Res. 174**,** 168-76.
Nunoya, K., Grant, C.E., Zhang, D., Cole, S.P., Deeley, R.G., 2003. Molecular cloning and pharmacological characterization of rat multidrug resistance protein 1 (mrp1). Drug Metab Dispos. 31**,** 1016-26.
Oikawa, T., Saito, H., Taniguchi, K., 2001. Immunohistochemical studies on the differential maturation of three types of olfactory organs in the rats. J Vet Med Sci. 63**,** 759-65.
Oka, Y., Omura, M., Kataoka, H., Touhara, K., 2004. Olfactory receptor antagonism between odorants. EMBO J. 23**,** 120-6.
Omura, M., Sekine, H., Shimizu, T., Kataoka, H., Touhara, K., 2003. In situ Ca2+ imaging of odor responses in a coronal olfactory epithelium slice. Neuroreport. 14**,** 1123-7.

Ottoson, D., 1955. Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium. Acta Physiol Scand Suppl. 35**,** 1-83.

Pataramekin, P.P., Meisami, E., 2005. Cytochrome oxidase staining reveals functionally important activity bands in the olfactory epithelium of newborn rat. J Neurocytol. 34**,** 257-68.

Pauli-Magnus, C., Kroetz, D.L., 2004. Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDR1 (ABCB1). Pharm Res. 21**,** 904-13.

Pelosi, P., 2001. The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. Cell Mol Life Sci. 58**,** 503-9.

Phillips, J.K., Lipski, J., 2000. Single-cell RT-PCR as a tool to study gene expression in central and peripheral autonomic neurones. Auton Neurosci. 86**,** 1-12.

Raaijmakers, H.G., Van Den Bosch, G., Boezeman, J., De Witte, T., Raymakers, R.A., 2002. Single-cell image analysis to assess ABC-transporter-mediated efflux in highly purified hematopoietic progenitors. Cytometry. 49**,** 135-42.

Rautio, J., Humphreys, J.E., Webster, L.O., Balakrishnan, A., Keogh, J.P., Kunta, J.R., Serabjit-Singh, C.J., Polli, J.W., 2006. In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. Drug Metab Dispos. 34**,** 786-92.

Reisert, J., Zhao, H., 2011. Perspectives on: information and coding in mammalian sensory physiology: response kinetics of olfactory receptor neurons and the implications in olfactory coding. J Gen Physiol. 138**,** 303-10.

Restrepo, D., Teeter, J.H., 1990. Olfactory neurons exhibit heterogeneity in depolarization-induced calcium changes. Am J Physiol. 258**,** C1051-61.

Reuter, D., Zierold, K., Schroder, W.H., Frings, S., 1998. A depolarizing chloride current contributes to chemoelectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ. J Neurosci. 18**,** 6623-30.

Roman, R.M., Wang, Y., Lidofsky, S.D., Feranchak, A.P., Lomri, N., Scharschmidt, B.F., Fitz, J.G., 1997. Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume. J Biol Chem. 272**,** 21970-6.

Roman, R.M., Lomri, N., Braunstein, G., Feranchak, A.P., Simeoni, L.A., Davison, A.K., Mechetner, E., Schwiebert, E.M., Fitz, J.G., 2001. Evidence for multidrug resistance-1 P-glycoprotein-dependent regulation of cellular ATP permeability. J Membr Biol. 183**,** 165-73.

Ros, J.E., Roskams, T.A., Geuken, M., Havinga, R., Splinter, P.L., Petersen, B.E., LaRusso, N.F., van der Kolk, D.M., Kuipers, F., Faber, K.N., Muller, M., Jansen, P.L., 2003. ATP binding cassette transporter gene expression in rat liver progenitor cells. Gut. 52**,** 1060-7.

Rosati, A., Maniori, S., Decorti, G., Candussio, L., Giraldi, T., Bartoli, F., 2003. Physiological regulation of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and cytochrome P450 3A2 during rat ontogeny. Dev Growth Differ. 45**,** 377-87.

Sakmann, B., Neher, E., 1984. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. Annu Rev Physiol. 46**,** 455-72.

Sasabe, H., Kato, Y., Suzuki, T., Itose, M., Miyamoto, G., Sugiyama, Y., 2004. Differential involvement of multidrug resistance-associated protein 1 and P-glycoprotein in tissue distribution and excretion of grepafloxacin in mice. J Pharmacol Exp Ther. 310**,** 648-55.

Savic, I., Gulyas, B., Larsson, M., Roland, P., 2000. Olfactory functions are mediated by parallel and hierarchical processing. Neuron. 26**,** 735-45.

Schiengold, M., Schwantes, L., Schwartsmann, G., Chies, J.A., Nardi, N.B., 2001. Multidrug resistance gene expression during the murine ontogeny. Mech Ageing Dev. 122**,** 255-70.

Schild, D., Restrepo, D., 1998. Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. Physiol Rev. 78**,** 429-66.

Schinkel, A.H., 1997. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. Semin Cancer Biol. 8**,** 161-70.

Schmid, A., Pyrski, M., Biel, M., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., 2010. Grueneberg ganglion neurons are finely tuned cold sensors. J Neurosci. 30**,** 7563-8.

Scott, J.W., Scott-Johnson, P.E., 2002. The electroolfactogram: a review of its history and uses. Microsc Res Tech. 58**,** 152-60.

Shepherd, G.M., 1972. Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. Physiol Rev. 52**,** 864-917.
Sicard, G., Holley, A., 1984. Receptor cell responses to odorants: similarities and differences among odorants. Brain Res. 292**,** 283-96.
Sicard, G., 1986. Electrophysiological recordings from olfactory receptor cells in adult mice. Brain Res. 397**,** 405-8.
Sleeman, M.A., Watson, J.D., Murison, J.G., 2000. Neonatal murine epidermal cells express a functional multidrug-resistant pump. J Invest Dermatol. 115**,** 19-23.
Spehr, M., Kelliher, K.R., Li, X.H., Boehm, T., Leinders-Zufall, T., Zufall, F., 2006. Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. J Neurosci. 26**,** 1961-70.
Stavrovskaya, A.A., 2000. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. Biochemistry (Mosc). 65**,** 95-106.
Steinke, A., Meier-Stiegen, S., Drenckhahn, D., Asan, E., 2008. Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and fila. Histochem Cell Biol. 130**,** 339-61.
Strotmann, J., Breer, H., 1991. Generation of monoclonal antibodies detecting specific epitopes in olfactory and respiratory epithelia. Cell Tissue Res. 266**,** 247-58.
Suzuki, Y., Takeda, M., Farbman, A.I., 1996. Supporting cells as phagocytes in the olfactory epithelium after bulbectomy. J Comp Neurol. 376**,** 509-17.
Thiebaud, N., Sigoillot, M., Chevalier, J., Artur, Y., Heydel, J.M., Le Bon, A.M., 2010. Effects of typical inducers on olfactory xenobiotic-metabolizing enzyme, transporter, and transcription factor expression in rats. Drug Metab Dispos. 38**,** 1865-75.
Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C., 1987. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 84**,** 7735-8.
Thommesen, G., Doving, K.B., 1977. Spatial distribution of the EOG in the rat; a variation with odour quality. Acta Physiol Scand. 99**,** 270-80.
Thornton-Manning, J.R., Dahl, A.R., 1997. Metabolic capacity of nasal tissue interspecies comparisons of xenobiotic-metabolizing enzymes. Mutat Res. 380**,** 43-59.
Toyoda, Y., Hagiya, Y., Adachi, T., Hoshijima, K., Kuo, M.T., Ishikawa, T., 2008. MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions. Xenobiotica. 38**,** 833-62.
Trotier, D., 1986. A patch-clamp analysis of membrane currents in salamander olfactory receptor cells. Pflugers Arch. 407**,** 589-95.
Tsai, C.E., Daood, M.J., Lane, R.H., Hansen, T.W., Gruetzmacher, E.M., Watchko, J.F., 2002. P-glycoprotein expression in mouse brain increases with maturation. Biol Neonate. 81**,** 58-64.
Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y., 1981. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Res. 41**,** 1967-72.
Twentyman, P.R., 1992. Cyclosporins as drug resistance modifiers. Biochem Pharmacol. 43**,** 109-17.
Tytgat, J., Vereecke, J., Carmeliet, E., 1988. Differential effects of verapamil and flunarizine on cardiac L-type and T-type Ca channels. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 337**,** 690-2.
Ueda, K., 2011. ABC proteins protect the human body and maintain optimal health. Biosci Biotechnol Biochem. 75**,** 401-9.
Varma, M.V., Ashokraj, Y., Dey, C.S., Panchagnula, R., 2003. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement. Pharmacol Res. 48**,** 347-59.
Viswaprakash, N., Dennis, J.C., Globa, L., Pustovyy, O., Josephson, E.M., Kanju, P., Morrison, E.E., Vodyanoy, V.J., 2009. Enhancement of odorant-induced responses in olfactory receptor neurons by zinc nanoparticles. Chem Senses. 34**,** 547-57.
Volk, H.A., Burkhardt, K., Potschka, H., Chen, J., Becker, A., Loscher, W., 2004. Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. Neuroscience. 123**,** 751-9.

Wielinga, P.R., van der Heijden, I., Reid, G., Beijnen, J.H., Wijnholds, J., Borst, P., 2003. Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. J Biol Chem. 278**,** 17664-71.

Wijnholds, J., Evers, R., van Leusden, M.R., Mol, C.A., Zaman, G.J., Mayer, U., Beijnen, J.H., van der Valk, M., Krimpenfort, P., Borst, P., 1997. Increased sensitivity to anticancer drugs and decreased inflammatory response in mice lacking the multidrug resistance-associated protein. Nat Med. 3**,** 1275-9.

Winegar, B.D., Rosick, E.R., Schafer, R., 1988. Calcium and olfactory transduction. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol. 91**,** 309-15.

Wioland, M.A., Fleury-Feith, J., Corlieu, P., Commo, F., Monceaux, G., Lacau-St-Guily, J., Bernaudin, J.F., 2000. CFTR, MDR1, and MRP1 immunolocalization in normal human nasal respiratory mucosa. J Histochem Cytochem. 48**,** 1215-22.

Ye, J.H., Zhang, J., Xiao, C., Kong, J.Q., 2006. Patch-clamp studies in the CNS illustrate a simple new method for obtaining viable neurons in rat brain slices: glycerol replacement of NaCl protects CNS neurons. J Neurosci Methods. 158**,** 251-9.

Zhang, X., Firestein, S., 2002. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. Nat Neurosci. 5**,** 124-33.

Zhao, Y., Migita, K., Sun, J., Katsuragi, T., 2010. MRP transporters as membrane machinery in the bradykinin-inducible export of ATP. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 381**,** 315-20.

Annexes

Annexes

A. Forum des jeunes chercheurs, 2009, DIJON, FRANCE.

B. XXth.European Chemoreception Research Organization Congress, 2010, AVIGNON, FRANCE.

C. Functional Evidence of Multidrug Resistance Transporters (MDR) in Rodent Olfactory Epithelium. PLoS One. 2012;7(5):e36167. Epub 2012 May 1.

N°59

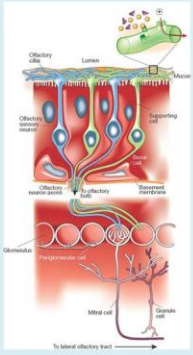
Enregistrements optiques des réponses de neurones olfactifs *in vivo* chez des rongeurs à l'aide d'une méthode d'imagerie calcique.

Molinas Adrien, Jakob Ingrid, Sicard Gilles.
Centre Européen des Sciences du Goût, CNRS, UMR 5170. 15 Rue Hugues Picardet 21000 Dijon

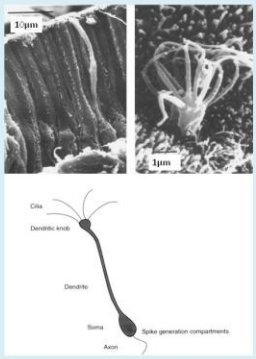
Objectif : mettre au point une méthode d'imagerie afin de rendre compte de l'activité électrophysiologique des neurones olfactifs *in vivo* en réponse à l'application d'un mélange d'odorants.

Physiologie de la réception olfactive

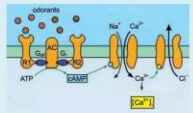
1]



2]

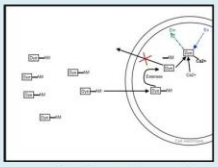


3]

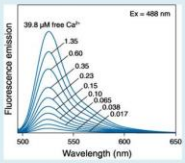


1] Périphérie du système olfactif. *(D'après Firestein S. 2001)*
2] Neurone Olfactif. *(D'après Schild D. et Restrepo D. 1998)*
3] Transduction dans les cellules réceptrices olfactives. *(D'après Frings S. 2001)*

Principe de fluorescence

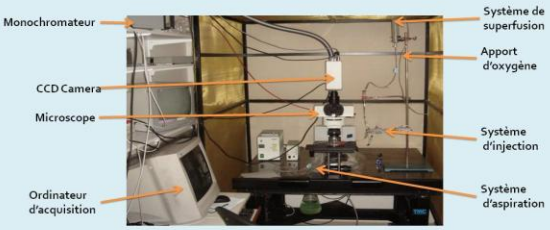


Chargement d'un fluorophore acétoxyméthyle ester (AM): le fluorophore lipophile grâce à son groupement AM pénètre dans la cellule. Le groupement AM est retiré par les estérases. Le fluorophore est piégé à l'intérieur de la cellule. Lié au Ca^{2+} et photoexcité il fluoresce.



Relation $[Ca^{2+}]$ / intensité de la fluorescence: exemple avec le fluo 3 AM. *(D'après Invitrogen: The Handbook; Tenth edition)*

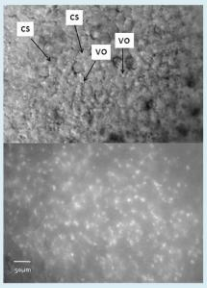
Poste de travail



Préparation : muqueuse olfactive entière

A

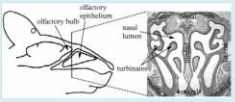
B



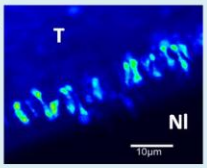
Surface de la muqueuse olfactive: muqueuse de souris vue du dessus. Grossissement X400. **[A]** vue en transmission. VO=vésicules olfactives; CS=cellules de soutien. **[B]** vue en fluorescence. Muqueuse incubée péalablement 45mn avec du Fluo3 AM à 5µM. Les points blancs sont les vésicules olfactives chargées de fluorophore.

Préparation : tranches coronales

A

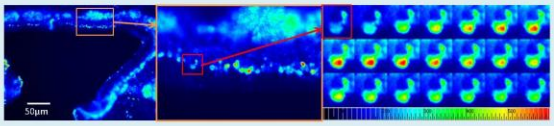


B

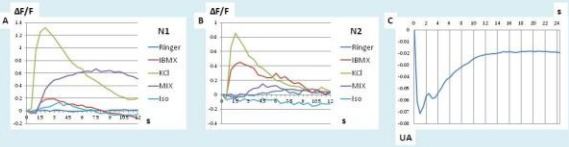


Tranches dans le plan coronal de la cavité nasale de souris nouveaux-nés. Epaisseur 100µm. **[A]** En transmission. **[B]** en fluorescence après 45mn d'incubation avec du Fluo 3 AM 5µM. Grossissement X400. Couleurs artificielles. T=Turbinates, Nl=Nasal lumen

Enregistrements optiques



Réponse d'un neurone olfactif à l'application de KCl 53mM: le KCl dépolarise le neurone olfactif et provoque une entrée de Ca^{2+}. On observe la variation de l'intensité de la fluorescence au cours du temps (2Hz).



Réponse de deux neurones olfactifs à l'application de divers substances: stimulation avec du Ringer=liquide physiologique, de l'IBMX=inhibiteur des phosphodiestérases, KCl, Mélange d'odorants et d'acétate d'isoamyle=odorant. La valeur de l'intensité de la fluorescence est mesurée à partir des pixels constituant chaque neurone olfactif **[A]** et **[B]**. **[C]** Profil quantitatif et temporel du stimulus.

Perspectives: apporter des données originales sur l'encodage ou la représentation des mélanges odorants par le système récepteur olfactif d'un mammifère.

Forum des jeunes chercheurs. 25 et 26 Juin 2009

Remerciements: Fondation Edmond Roudnitska.

Evidence for Multidrug resistance transporter activity in the olfactory epithelium of rodents.

Molinas, A. , Sicard, G. and Jakob, I.
Centre des Sciences du Goût, CNRS, Université de Bourgogne, Dijon, France

Introduction

We observed that intact main olfactory epithelia from rodents showed impaired and slow accumulation of fluorescent molecules like FURA -2AM. Fluorescent probes are well known substrates for multidrug resistance (MDR) transporters. Among MDR transporters specially P-glycoprotein (P-gp) and a multidrug associated protein (MRP) have been recognized as export-efflux pumps extruding xenobiotics and a vaste array of diverse chemicals. Here we tested :

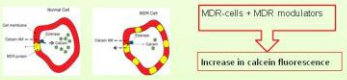
1) whether such MDR transporters are effective in the olfactory mucosa of mice and rat. We assessed MDR transporter activity by means of a calcein-AM fluorescence uptake assay in the presence of specific P-gp and MRP modulators on olfactory tissue slices of neonatal mice and rat. We next asked the question:

2) whether P-gp or MRP might be involved in the olfactory response. We recorded electroolfactograms (EOG) from the olfactory epithelium overlying nasal septum and turbinates of adult rat and mice in response to different odorants in the presence of specific modulators of P-glycoprotein and MRP.

Material & Methods

Animals: Mice (balb/c) and rat (Whistar) of postnatal day 0-3, adult animals

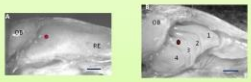
Calcein-AM fluorescence assay: Principle of the MDR-calcein assay



Coronal tissue slices (100 or 150 µm) were made from main olfactory epithelium of mice and rats (0 - 3 days postnatal). Slices were fixed in a recording chamber and incubated with calcein-AM in the absence or presence of MDR modulators. Calcein excitation was at 480 nm. Fluorescence changes were monitored by an imaging system (Till Photonics, Olympus BX 51) at fixed intervals. Intensities were calculated as average intensities over all pixels of defined areas of the olfactory mucosa.

Electroolfactograms (EOG): *EOGs were recorded in the submerged field recording technique from the surface of the olfactory epithelium of the septum and the turbinates. The output signal was fed into a A/D converter, digitized at a rate of 100 Hz and analyzed using Axon software. Stimuli were applied via a rotary valve . We evaluated the maximum amplitude of the EOG waveform in response to odorant and stimulus application.*

Odorants: *The odorant stimulus set consisted of a mixture of eight different odorants, two pure odorants and control stimuli.*
The mixture: isoamyl acetate,benzaldehyde,2-heptanone, octanal, acetophenone, octanoic acid, 1,8-cineole, 1-octanol.
Pure odorants: isoamyl acetate , 2-5 dimethyl pyrazine
Control stimuli: KCl (140 mM), IBMX



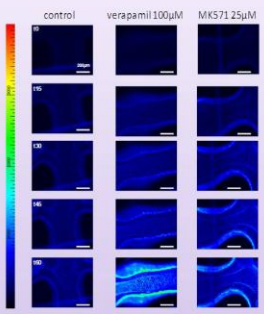
Photographic view of the septum (A) and the turbinates (B) of a rat's main olfactory epithelium . Recording sites are marked with circles. Scale bar = 5 mm .

List of MDR modulators used in both assays

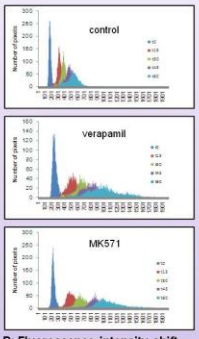
Target	MDR MODULATORS		
	Modulator	*Calcein-AM assay*	*EOG recording*
P-glyco protein	verapamil	100 - 200 µM	200 – 400 µM
	cyclosporin A	5, 10 µM	5, 10, 15 µM
	PGP-4008	10, 20, 25 µM	nt
MRP	probenecid	2.5, 5 mM	2.5, 5 mM
	MK571	10, 25, 50 µM	10, 25, 40 µM

Results

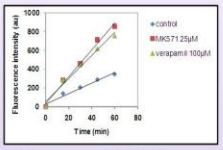
1: MDR modulators for P-glycoprotein and MRP1 enhance calcein-AM uptake in olfactory tissue slices



A: P-gp and MRP dependent calcein accumulation. Examples of fluorescence calcein imaging in olfactory slices in the absence and presence of two different MDR modulators in tissue slice from a neonatal rat. Pseudocolor images were taken every 15 min over a period of 60 min. Calcein-AM concentration was1 µM; color bar scale: 0-4095



B: Fluorescence intensity shift in the presence of verapamil and MK571. Histograms of fluorescence intensity of images from olfactory tissue slices as shown in A for time intervals of 15 min. Pixel intensities are averaged over defined areas of the olfactory mucosa



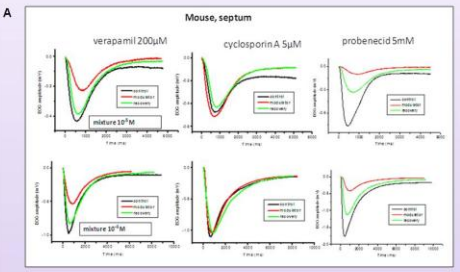
C: Time course of calcein-AM accumulation in the absence (control) and presence of two MDR modulators . Data are constructed from intensity histogram in B

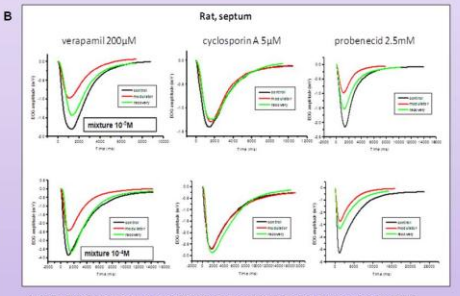
D

Effect of modulators on calcein-AM uptake			
Accumulation ratio			
Modulator	*concentration*	*Mouse*	*Rat*
verapamil	100µM	1.01-2.20 (2)	0.70-2.20 (3)
	200µM	2.04-3.71 (3)	1.48-1.76 (3)
cyclosporin A	5µM	1.62-3.07 (2)	0.82-1.07 (4)
	10µM	1.94-4.57 (7)	1.59-3.25 (4)
PGP-4008	10µM	1.11 (1)	0.44-1.11 (3)
	20µM	0.72-0.80 (2)	0.84-0.87 (2)
probenecid	2.5mM	2.97-3.00 (2)	0.99-2.00 (5)
	5mM	2.28 (1)	0.76-1.48 (4)
MK571	25µM	3.03-3.38 (3)	0.97-2.54 (3)
	50µM	2.49-3.38 (3)	1.96-3.91 (2)

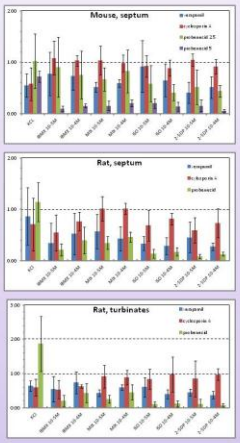
D: Accumulation ratios of calcein–AM uptake rates were calculated from slopes (rates) in the presence of a MDR modulator

2: Some MDR modulators interfere with odorant induced activity: effect on EOG amplitude





A & B: EOG response amplitude is modified in the presence of MDR modulators. Examples of odorant induced EOG responses of the odorant mixture to two different concentrations in the presence of different MDR-modulators. All responses were recorded in the middle of the septum of mouse or rat. The effect of the modulators were reversible as shown by the recovery.



C: Comparison of the modulatory effect of MDR modulators on EOG amplitude. Bar chart of the maximum amplitude of EOGs in the presence of different MDR modulators. EOG amplitudes were standardized to control responses and set to unity in each recording set. Diagrams are constructed from recordings on the septum of mouse , septum and turbinates of rat in response to KCl, IBMX, odorant mixture and odorants (n=4).

Summmary & Conclusion

- MDR transporters are present and localized to the olfactory mucosa of mice and rat
- P- glycopprotein and MRP type transporter are functional as evidenced by the effect of enhanced calcein-AM uptake in the presence of specific modulators of P-gp and MRP-transporters
- Modulators of the MRP transporter (and not of P-gp) attentuate the EOG amplitude of odorants and odorant mixtures.
- The data suggest the presence of active P-glycoprotein and MRP type transporters. In the olfactory mucosa of rodents at birth.
- MRP type transporters might be directly or indirectly involved in the olfactory response

This work was supported by a grant of the Fondation Edmond Roudnitzka to AM

ECRO meeting 2010, AVIGNON

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Functional Evidence of Multidrug Resistance Transporters (MDR) in Rodent Olfactory Epithelium

Adrien Molinas, Gilles Sicard, Ingrid Jakob*

Equipe Neurophysiologie de la Peripherie des Systèmes Chimiosensoriels, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS UMR 6265, INRA, Université de Bourgogne, Dijon, France

Abstract

Background: P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance-associated protein (MRP1) are membrane transporter proteins which function as efflux pumps at cell membranes and are considered to exert a protective function against the entry of xenobiotics. While evidence for Pgp and MRP transporter activity is reported for olfactory tissue, their possible interaction and participation in the olfactory response has not been investigated.

Principal Findings: Functional activity of putative MDR transporters was assessed by means of the fluorometric calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM) accumulation assay on acute rat and mouse olfactory tissue slices. Calcein-AM uptake was measured as fluorescence intensity changes in the presence of Pgp or MRP specific inhibitors. Epifluorescence microscopy measured time course analysis in the olfactory epithelium revealed significant inhibitor-dependent calcein uptake in the presence of each of the selected inhibitors. Furthermore, intracellular calcein accumulation in olfactory receptor neurons was also significantly increased in the presence of either one of the Pgp or MRP inhibitors. The presence of Pgp or MRP1 encoding genes in the olfactory mucosa of rat and mouse was confirmed by RT-PCR with appropriate pairs of species-specific primers. Both transporters were expressed in both newborn and adult olfactory mucosa of both species. To assess a possible involvement of MDR transporters in the olfactory response, we examined the electrophysiological response to odorants in the presence of the selected MDR inhibitors by recording electroolfactograms (EOG). In both animal species, MRPs inhibitors induced a marked reduction of the EOG magnitude, while Pgp inhibitors had only a minor or no measurable effect.

Conclusions: The findings suggest that both Pgp and MRP transporters are functional in the olfactory mucosa and in olfactory receptor neurons. Pgp and MRPs may be cellular constituents of olfactory receptor neurons and represent potential mechanisms for modulation of the olfactory response.

Citation: Molinas A, Sicard G, Jakob I (2012) Functional Evidence of Multidrug Resistance Transporters (MDR) in Rodent Olfactory Epithelium. PLoS ONE 7(5): e36167. doi:10.1371/journal.pone.0036167

Editor: Maria A. Deli, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Hungary

Received November 17, 2011; **Accepted** April 2, 2012; **Published** May 1, 2012

Copyright: © 2012 Molinas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: AM was supported by a PhD fellowship from the Fondation Edmond Roudnitska (Paris, France). The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. No additional external funding was received for this study.

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

* E-mail: ingrid.jakob@u-bourgogne.fr

Introduction

Among the numerous protein transporter systems present in many mucosal and epithelial tissue a few are toxically relevant efflux transporter proteins. They belong to the superfamily of binding cassette transporters (ABC transporters), transmembrane ATP-driven export pumps, and include amongst others two important members of two subfamilies, the P-glycoprotein (Pgp, gene symbol *ABCB1*) and the multidrug-associated resistance protein MRP1 (MRP1, gene symbol *ABCC1*). These proteins are especially well-known for their role in mediating the phenotype of multidrug resistance (MDR) seen in cancer cells where MDR is an acquired resistance against multiple chemotherapeutic drugs [1,2]. Moreover these transporters are known to exert a protective role against toxicity of endo-and xenobiotics [3].

Beyond its inauspicious role in cancer treatment, Pgp has an important physiological function in normal tissue. In mammals, Pgp is constitutively expressed in cells specialized in selective or secretory transport, and generally in all tissues in which a highly selective compartmentalization is needed, such as kidney, pancreas, adrenal, glands, colon, jejunum, liver, brain [4]. Pgp has also been detected in tissues with barrier functions, such as in endothelial cells of the blood-brain barrier [5]. MRP1 ubiquitously distributed in tissue [6] is like Pgp an organic anion transporter protein, albeit with a different substrate profile. Pgp being a transporter with broad specificity [7] transports large hydrophobic positively charged molecules out of the cell, while preferred substrates of MRP1 are conjugated organic anionic compounds, some peptides and neutral compounds conjugated to glutathione, glucuronate or sulfate. Due to its ubiquitous presence in normal cellular physiology, various physiological functions including tissue defense against xenobiotic and endogenous toxic metabolites [8] are proposed.

Peripheral sensory systems like olfaction and taste localized at the interface between environment and body possess natural physical cellular structures with barrier characteristics [9] but are further endowed with a protective biochemical barrier. Detoxifying enzymes are particularly important in epithelia exposed to

xenobiotic chemicals. The nasal tissue, especially, at the entry route to the CNS, has provided its different mucosal epithelia with several xenobiotic metabolizing enzymes [10–12] transforming xenobiotics into metabolites that are more readily absorbed. Multidrug transporters like Pgp and MRP1 are also expressed in nasal tissue, as well in respiratory and olfactory epithelia [10,12–14]. The olfactory epithelium, segregated from the respiratory epithelium, lines the dorsal part of the nasal cavity harboring the olfactory receptor neurons (ORNs). Their specialized cilia are confronted with external cues which are beneficial or detrimental to the receiving organism. ORNs are first-order neurons, surrounded by supporting or sustentacular cells forming the apical layer of the olfactory mucosa. The underlying biochemical events of odorant detection and signal transduction are now well elucidated [15,16].

In olfactory epithelium (OE) of bovine and mouse [17,18]. Pgp has been localized to the apical cell layer, most likely to sustentacular cells. Also a very robust immunolocalization of MRP1 to sustentacular cells of the rat OE has recently been shown by Kudo et al. [19]. Further expression of MRP1, MRP3, MRP 4 and MRP 5 has been reported in the olfactory epithelium of rat [14,19,20]. The few functional MDR activity tests in OE of mammals have focused on Pgp transport activity across excised olfactory tissue or whole animals, and so far no functional test for MRP1 has been performed. Transporter activity of Pgp and MRP has been shown in OE of *Xenopus* tadpoles expressing the two transporter systems in sustentacular cells and olfactory neurons [21].

In the present study we assessed the function of the two transporters Pgp and MRP1 involved in multidrug resistance in the olfactory epithelium and compared two animal species. The calcein-AM assay is one of the best choices to probe MDR activities [22,23] and analysis of fluorochrome efflux in combination with pharmacological tools is the major indicator of their expression and function. We confirmed MDR transporter expression in the OE by reverse transcription–PCR analysis and revealed constitutive expression of Pgp and MRP1 in newborn and adult animals.

To investigate whether MDR transporters may be directly or indirectly implicated in the olfactory response we conducted electrophysiological analysis of odorant-evoked responses by electroolfactogram recordings (EOGs) which measure mainly the odorant induced generator potentials thus reflecting initial stimulus-induced events from the periphery.

Materials and Methods

Animal treatments

All procedures involving animals were conducted in accordance with a protocol approved by the Local Ethics Committee for Research on Animals of the University of Bourgogne (France) under the approval number B1910. The care and husbandry of animals was in conformity with guidelines of the European Communities Council directive of Nov, 1986, (86/609/EEC). Adult Wistar rats and BALB/c mice of both sexes (2 to 7 months old) were purchased from Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France, mouse and rat pups were provided by the local animal facility. Adult animals were deeply anesthetized by carbon dioxide inhalation, rat and mouse pups by hypothermia, and sacrified by decapitation.

Calcein accumulation assay

A specific test for multidrug transporter-mediated activity is to measure intracellular calcein accumulation in the presence or absence of MDR inhibitors. Calcein acetoxymethlyl ester (calcein-AM) is a lipophilic, nonfluorescent dye that diffuses into cells where it is cleaved by cytosolic esterase to a green fluorescent dye. The amount of transporter activity is therefore inversely proportional to the accumulation of intracellular calcein fluorescence. Imaging experiments with calcein-AM were performed with a monochromator-based imaging system (Polychrome V, Till Photonics, Graefelfing, Germany) attached to an upright microscope (Olympus BX51WI) via a light guide and viewed with a x10 water immersion objective (UMPlanFl, NA 0.30). Fluorescent images were acquired with an IMAGO QE cooled charge-coupled device camera (PCO AG, Kelheim, Germany) controlled by the TILLvisION 4.0 software (TILL Photonics). The excitation wavelength for calcein was 480 nm and emitted light was collected by an appropriate dichroic mirror. Coronal slices of 100 and 150 µm thickness were prepared from olfactory epithelium of newborn mice and rats at postnatal day 0 to 2. Rapid hardening of the nasal bones and cartilage prevented exact acute slicing in older animals. Sections of the middle to dorsal portion of the nasal cavity where the olfactory bulbs are just apparent were cut on a vibrating slicer (Leica VT 1000 M/E, Nussloch, Germany) while submerged in cold standard Ringer solution. Slices were stored at 4°C in Ringer until transfer to an immersion chamber for optical recording at room temperature (RT).

A calcein accumulation experiment was performed in individual but serially adjacent slices from one animal, yielding normally 2–4 slices. As one slice was incubated with calcein–AM alone serving as control, thus allowing each experiment to have its own control, the remaining "sister" slices were loaded each with calcein-AM concomitantly one inhibitor. Calcein-AM concentration was in all instances 1 µM.

Typically one to three of the different inhibitors were studied in slices from one animal. A pre-incubation period of 8 min was necessary before fluorescence recording could be started. Thereafter images were recorded in a time series from 0 (t = 0) to 60 min (t = 60) at fixed 15-min intervals over 60 minutes of experiment. Calcein accumulation was measured as averaged pixel intensity inside of regions of interest (ROIs) for each time point in the 60 min sequence. For evaluation at the tissue level ROIs were delineated over an area extending over the entire height of the olfactory epithelium. Areas of different size and shapes or position gave essentially the same information and in each ROI no distinction was made between populated or non-populated pixel areas. Rates of change over time were calculated from slopes by linear regression. In addition, fluorescence intensities at the intracellular level of single cells were evaluated from fluorescence images (snapshot) at the 60 min end-point where small ROIs (8–12) were placed over the cell bodies of single cells. Ratios of inhibitor-to-control fluorescence intensities were than calculated from corresponding end-point images of the same series. Background fluorescence was subtracted in all recordings and determined using ROIs of identical shape and size as for evaluation, but placed in a cell-free area of the image.

Electroolfactograms

We recorded electroolfactograms (EOGs) in the submerged field potential recording technique adapted from [24] with some modification. The severed head was cut in the mid-sagittal plane to expose the nasal septum in its totality, or after its careful excision the underlying endoturbinates. We recorded either from matched locations on the septum in rat and mouse, and additionally from a location in turbinate IIb of rat. Recordings were done by means of an Ag/AgCl wire in a disposable plastic gel loader tip filled with conductive gel (WPI, UK) and an Ag/AgCl disc positioned under the head serving as reference electrode. Both

were connected to a custom-built differential amplifier. Signals were low pass filtered, sampled at 100 Hz, and digitized via a data-acquisition board (National Instruments, France) run by custom-made software on a personal computer. Data were later analyzed using Clampfit 8 (Axon Instruments, DIPSI, France) and other commercial software. The olfactory region was continuously superfused with a thin film of standard Ringer solution fed by gravity at a flow rate of 9 mL/min. Test stimuli were applied via a valve-operated loop (Rheodyne, Bioblock, France) with a volume of 120 µL allowing direct switching to the desired test solution.

Solutions and chemical stimuli

The standard Ringer consisted of (in mM) 140 NaCl, 5 KCl, 2 $CaCl_2$, 2 $MgCl_2$, 10 HEPES adjusted to pH 7.2–7.3 and to 310 mosm with glucose. Ringer containing the appropriate concentration of transporter inhibitor are referred to as inhibitor-Ringer. MDR transporter inhibitors used were verapamil, cyclosporin A, probenecid, and MK571, prepared as 1 M stock solutions in Ringer except for probenecid which was dissolved in a diluted solution of NaOH buffered to pH 7.3 and prepared on the day of the experiment. Cyclosporin A was prepared as 25 mM stock solution. The following odorant and test stimuli were used: isoamyl acetate and 2,5-dimethyl pyrazine as single/pure odorants, and a mixture composed of isoamyl acetate, benzaldehyde, 2-heptanone, octanal, 1-octanol, acetophenone, octanoic acid, and 1,8-cineole. Odorants were prepared as 1 M stock solutions, 3-isobutyl-1-methyl-xanthine, (IBMX) and the mixture as 10^{-1} M stock solutions in dimethylsulfoxide (DMSO), elevated K^+solution was the same as Ringer except that NaCl was replaced by 140 mM KCl. Final dilution in Ringer or inhibitor-Ringer to the desired concentration was freshly made before each experiment. Stimuli were diluted either in Ringer or inhibitor-Ringer. Test stimuli concentrations are reported as 'loop' concentration and not corrected for further dilution in the bath. Final DMSO concentration was maximally 0.01% or less with exception of the IBMX solution containing 0.1%, giving rise to a small EOG contributing to 3–5% of the maximal IBMX-induced EOG amplitude. Calcein-AM was prepared as 1M stock solution in DMSO and diluted to a final concentration of 1 µM in standard or inhibitor-Ringer at the start of the experiment. All experiments were performed at room temperature (20°–22°C).

Olfactory modulation experiments

Modulation experiments involved the acquisition of three successive series of EOG recordings evoked by a standard stimulation protocol consisting of a set of stimuli sequentially presented to the olfactory mucosa. We acquired (1) an initial control series of EOGs in standard Ringer solution, (2) after having switched to inhibitor-Ringer for 10 min, a second series of EOGs in the presence of the desired inhibitor and stimuli prepared in inhibitor Ringer, (3) a third series of EOGs in standard Ringer was started after a 20 min period of washout with standard Ringer. This procedure was used for all inhibitor experiments, except that MK571-containing Ringer was superfused for only 3 min. The stimulus protocol consisted of sequentially applying KCl, IBMX, the odorant mixture, isoamyl acetate and 2, 5-dimethyl pyrazine. With the exception of KCl, the stimuli were presented at a concentration of 10^{-5} and 10^{-4} M. Inter-stimulus interval was at least 2 minutes. Peak amplitude of the EOG response was measured as the maximum negative voltage deflection from baseline. For comparison of response kinetics EOG waveforms were normalized to their peak amplitudes. EOG rise times were defined as the time of the start to the peak of the response. For comparison the rates of rise were fitted to a sigmoidal function and the half-maximal activation (V_{50}) of treated and control EOGs compared by a paired *t*-test. For comparison of decay time waveforms were aligned on the peak of the amplitude and inspected for disparities.

RT-PCR on olfactory epithelium

Tissue samples of liver and main olfactory epithelium of adult (n = 2) and neonate (n = 2) animals of each species were rapidly removed into PCR tubes, snap frozen in liquid nitrogen and stored at−80°C until RNA extraction. To avoid contamination with respiratory cells only the caudal/ posterior one third of the olfactory mucosa of the septum was peeled off from the cartilage thereby avoiding also the area near the choanae (herein after referred to as simply olfactory mucosa). Total RNA was extracted from frozen tissue using RNeasy™ Plus mini Kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions. The quantity and purity of RNA was determined with a spectrophotometer (Nanodrop 2000 Thermo Scientific). 1.3 µg RNA was reverse transcribed using Superscript III First strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) and oligo dT primers in a UNO II Thermocycler (Biometra). PCR reaction was performed using standard protocols with TaqPCR Master Mix (Qiagen, France). PCR amplification was started with an initial denaturation in one cycle at 98°C for 60 s, followed by denaturation step of 98°C for 30 s, annealing at 60°C for 40 s, and extension at 72°C for 60 s, for a total of 35 cycles, followed by a final extension step at 72°C for 5 min. Negative controls for contamination by extraneous DNA (omission of reverse transcriptase) and RNA were run with each set of reactions. Positive controls were done by amplification of a cDNA fragment of cyclophilin A, a housekeeping gene. Amplified cDNAs were separated by electrophoresis in a 1.3% ethidium bromide stained agarose gel and visualized under UV light on a Molecular Imager Gel Doc XR System (Bio-Rad). The specificity of the PCR product was confirmed by sequencing.

Specific primers were designed by Blast searching using publicly available sequence information of the GenBank of the National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) and purchased from Operon (Eurofins MWG Operon, Germany).

Data analysis

All figures giving qualitative information represent typical results of at least three different experiments (stated when less). Statistical analyses were performed using a two-tailed paired ratio *t*-test [25] or one-sample *t*-test where appropriate. In both cases differences were considered significant at $p<0.05$. Linear regression analysis was carried out to analyze calcein uptake rates and linear relationships with R^2 values greater than 0.95 were used. To detect far outliers Grubbs test was applied. All data analyses were carried out with GraphPad 4.0. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD).

Chemicals

Calcein-AM was purchased from Invitrogene (France), IBMX from Calbiochem (France), Verapamil and MK571 from Biomol (France), all other chemicals were obtained from Sigma Aldrich (St. Quentin, France).

Results

Functional testing of multidrug resistance transporter activity

A specific test for multidrug-transporter mediated activity (MDR) is to measure intracellular calcein accumulation in the

absence and presence of MDR inhibitors. The assay is based on the use of lipophilic acetoxymethyl ester of calcein (calcein-AM), which crosses membranes. Once internalized and enzymatically converted to calcein, the dye becomes highly fluorescent. Both calcein-AM and calcein have been shown to be substrates for MRP, but only calcein-AM is a substrate for Pgp [23]. To examine the functional activity of MDR transporters we incubated olfactory tissue slices of newborn mice and rats with calcein-AM in the presence or absence of appropriate MDR inhibitors. Fluorescence data were obtained from 28 slices from mice (n = 16) and 30 slices from rats (n = 19).

Calcein-AM application led to an immediate but faint fluorescence rise in olfactory tissue slices, and was barely detectable during the first 8 minutes, not revealing morphological structures of the tissue. This made it difficult to report the increase in fluorescence during this time of incubation considered as pre-incubation. Thereafter, the time series experiment was started at time 0 and images sequentially acquired at fixed intervals of 15 min for a period of 60 min. Figure 1 B illustrates a representative fluorescence distribution pattern in a part of a coronal section through the mid-septal portion of the OE after incubation in 1 μM calcein-AM for a period of 30 min. Calcein fluorescence distribution was non-homogenous within the slice and developed primarily within the olfactory epithelium layer as indicated in the corresponding transmission micrograph (Figure 1A) showing the general morphological aspects of the same section with its three distinct main layers. The outer and upper layer represents the olfactory epithelium (OE), the subjacent layer, the lamina propria (LP), consists of connective tissue with nasal glands, blood vessels, and olfactory nerve/axon bundles (fila olfactoria, FO) which also accumulate calcein. These two layers overlay the nasal cartilaginous bone (CS) with its chondrocytes where a faint and patchy staining of calcein fluorescence was also observed. Generally similar patterns of fluorescence distribution for calcein appeared in mouse and rat slices. Calcein uptake was estimated from intensity changes in calcein fluorescence and evaluated in regions of interest (ROIs) from all five time points. Figure 1C shows the fluorometric time course of calcein accumulation over the 60 min experimental period into the OE of mice and rats in absence of MDR inhibitors. Fluorescence rose steadily and increased quasi linearly without saturation over the time of experiment. Average calcein fluorescence levels in the OE were similar in magnitude in both species but there was considerable variation in fluorescence uptake among individual specimens. Uptake rates calculated from slopes by linear regression ranged from 3.04–15.61 in rats and from 3.86–16.17 in mice (arbitrary units/time, a.u./60 min).

Next we evaluated the effect of various inhibitors of MDR transporters on calcein accumulation. The following four agents well recognized for their MDR reversing or inhibiting capacities were tested: verapamil and cyclosporin A are inhibitors of the Pgp transporter, while probenecid and MK571 are inhibitors of MRP-transporters. Direct observation by fluorescence microscopy revealed that inhibitor-incubated tissue slices always exhibited stronger fluorescence emission than when incubated with calcein-AM alone. This is illustrated in the example in Figure 2A for images of the 0, 30 and 60 min time points from mouse olfactory slices incubated with calcein-AM or concomitantly with MK571. When compared to the control with calcein, fluorescent visualization of the MK-treated slice demonstrated a progressively increasing change in brightness already at the starting time point 0 (after 8 min of pre-incubation). Brightness was pronounced at the 30 min time point, and at the 60 min time point fluorescence intensities in the MK–treated mouse slice covered the full range of the 4065 intensity levels approaching partially sub-saturation to slight saturation levels in a small band in the center of the OE. Saturation occurred under the given recording conditions in all mouse slices (4/4), but not in rat slices (0/4).

A more quantitative evaluation of calcein fluorescence changes was carried out from regions of interest (ROIs) over the whole height of the OE. The time-dependent fluorescence changes (of non-saturation levels) of the above experiment showed an almost linear increase over the 60 min period (Figure 2B) with a mean fluorescence intensity of 575 a.u. for the calcein control and 2000 a.u. for the MK-treated slice at the 60 min time point, a value that is 3.3-fold of that of the control value. The uptake rate, as calculated from slopes, was 28.07 for MK and 7.5 for calcein which represents approximately a4-fold increase. All of the four inhibitors tested increased calcein fluorescence in mice OE, but with different efficiencies. Figure 3 compares and summarizes the effect of inhibitors on the rates of calcein accumulation in mouse and rat slices. The increase was concentration dependant and the effect was statistically significant at the highest concentration tested, for verapamil at 200 μM, cyclosporin 10 μM, and probenecid at 5 mM. Figure 3A also shows that increasing the concentration of MK from 25 to 50 μM in mouse slices did not further increase fluorescence intensities. In rat slices, all inhibitors tested had a clearly visible fluorescence effect, but calcein accumulation during inhibitor application was in general less than in mouse slices (Figure 3B). MK was significantly effective at both concentrations of 25 and 50 μM and cyclosporin at 10 μM. Probenecid was significantly effective only at 2.5 mM. In both species transporter inhibition by MK induced the highest uptake rate, followed by cyclosporin. The experiments described above demonstrated a significant effect on calcein accumulation by Pgp and MRP-dependent inhibitors and the results suggest the presence of at least two functional MDR transporters in the OE.

Because the whole surface of the OE was incubated and exposed to calcein-AM, the above method measured the tissue response from a heterogeneous cell population in the OE and did not distinguish individual cell types. The OE consists of at least three different cell types organized in horizontal layers, but due to a general lack of contrast of the conventional fluorescence image it was not possible to reveal the exact tissue and layer boundaries. The small narrow band in the center of the OE, however, could be identified as the layer populated by the cell bodies of olfactory receptor neurons (ORNs). Within this layer details on cell morphology and dendritic knob-bearing structures became best detectable by the end of the experiment at the 60 min time point as shown in Figure 4A. This made it possible to evaluate inhibitor-dependent calcein accumulation in single ORNs (Figure 4B) from end-point images of before described recordings. We calculated ratios of intracellular fluorescence accumulation in single ORNs in the absence and presence of the four tested inhibitors. MK had the largest inhibitory effect and significantly increased calcein in mice ORNs about 3-to 4fold and 2-to 3-fold in rats (Figure 4C). In mice ORNs, probenecid at 5 mM, and cyclosporin at both tested concentrations was also effective. In rats, probenecid was only significantly effective at a concentration of 2.5 mM, cyclosporin and verapamil at the highest concentration tested. In some instances we were also able to evaluate the fluorescence changes at the 60 min end-point for a small number of sustentacular cells. Cells were selected on morphological criteria and evaluated for fluorescence changes in presence of 10 μM cylosporin or 50 μM MK571. As for ORNs, MK appears to have the largest inhibitory effect increasing fluorescence about 2.5-fold in mouse and 3.4-fold in rat sustentacular cells while fluorescence increase with cyclosporin was 2-fold for mouse and rat (not shown).

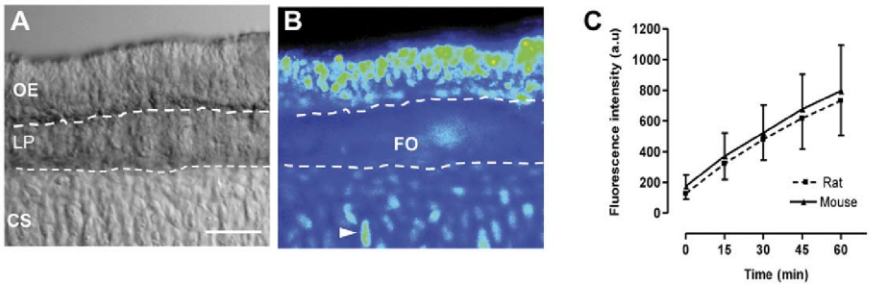


Figure 1. Calcein fluorescence pattern and accumulation in olfactory tissue slices of mouse and rat. A: Transmission light micrograph of a part of a typical coronal section through the main olfactory epithelium of mouse featuring three main layers: the olfactory epithelium (OE), the lamina propria (LP) and the nasal cartilage of the septum (CS). **B:** Pseudocolored fluorescence image of the same section after 30 minutes of incubation with 1 μM calcein-AM. Note that main staining occurred in the OE, some staining in the LP mainly in the fila olfactoria (FO), and cartilage cells, the chondrocytes (arrowhead). **C:** Time-dependent changes of calcein accumulation in the OE of rats (n = 19) and mice (n = 16) as determined from average fluorescence intensities of regions of interests (ROIs) at indicated time points. Fluorescence intensity in arbitrary units (a.u), scale bar in A = 50 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0036167.g001

Presence of *mdr1a, mdr1b* and *mrp1* mRNA in olfactory tissue

To further corroborate the results of the functional activity of multidrug transporters, RT-PCR was undertaken to confirm whether the encoding gene for drug-efflux conferring multidrug resistance transporters P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance-associated protein (MRP) were expressed in olfactory mucosa. We tested for mRNAs of the two P-glycoprotein isoforms, Mdr1a and Mdr1b, and Mrp1 in olfactory mucosa and liver tissue in newborn and adult rats and mice. To ensure olfactory tissue purity we took great care to avoid respiratory epithelium contamination in our samples. Specific primer pairs for the detection of the mouse and rat *mdr1a*, *mdr1b* and *mrp1* cDNAs (Table 1) were used. These primers were designed to amplify cDNA from mRNA and not genomic DNA sequences. Agarose gel separation of the amplification products showed cDNA fragments of the expected size (Table 1) for all three transcripts. All samples of rat and mouse tissue tested expressed *mdr1a*, *mdr1b* and *mrp1* (Figure 5 A, B). Cyclophilin A was used as a positive RT-PCR control (c in Figure 5 A, B). As expected, no bands were detected in the negative control, which consisted of replacing cDNA templates with water (in Figure 5 A, B). PCR products were sequenced to confirm identity of the amplicons. The analysis revealed the presence of mRNA for both isoforms of P-glycoprotein, Mdr1a and Mdr1 b, and Mrp1 which indicates that the genes are very likely expressed in olfactory mucosa and liver of newborn and adult animals. This expression pattern persisted throughout the developmental period into adulthood.

Modulation of the olfactory response

To test the hypothesis that MDR activities may be involved in the peripheral processing of odorants we directly assessed the function of the olfactory neurons by recording stimuli evoked electroolfactograms (EOGs) in the absence and the presence of MDR inhibitors. We sampled EOG responses from two olfactory mucosal surfaces, the septum (n = 18) and the turbinate (n = 18) in rat, and from a matching recording site in the mouse septum (n = 20). A series of chemical and odorant stimuli were presented, consisting of KCl, IBMX, an odorant mixture, and two different pure odorants, isoamyl acetate and 2,5-dimethyl pyrazine. IBMX is a phosphodiesterase inhibitor thus increasing cAMP which leads in turn to cyclic nucleotide channel (CNG) activation. KCl activates voltage-dependent channels i.e. Na^+ and Ca^{2+} and is a measure of the general excitability of the preparation.

Representative control EOG traces evoked by the series of stimuli at a concentration of 10^{-4} M recorded in the septum of rat and mouse, respectively, are represented in Figure 6A. Qualitative similar recordings were also obtained from the recording site in the turbinate of the rat. As expected EOG waveforms varied with stimuli, as well as with animals and the recording location. All responses were characterized by monophasic negative waveforms with a rapid rise to peak and a slower return to baseline or near to the baseline. With the exception of KCl, all stimuli were tested at two increasing concentrations, at 10^{-5} and 10^{-4} M. Response magnitude was concentration-dependent (not shown) and the relation between the peak amplitude of the two concentrations varied between 1.8 and 3.2-fold depending on the substance. Odorant responses were largest in the septum of the rat. Mean peak amplitude evoked by the mixture at a concentration of 10^{-4} M was 3.92±0.85 mV ranging from 2.55–5.46 mV, while isoamyl acetate at the same concentration produced a mean amplitude of 1.28±0.56 mV ranging from 0.61 to 2.73 mV. Compared to rats, all stimuli induced-response magnitudes in mice were generally, approximately between 64–72 % smaller (Figure 6A), i.e. the mixture-evoked mean peak amplitude for the concentration of 10^{-4} M was 1.18±0.36 mV ranging from 0.52–1.77 mV. For the modulation experiments the four different previously tested inhibitors were applied at the following concentrations, verapamil at 200 μM, cyclosporin at 5 μM, probenecid at 2.5 mM, and MK at 25 μM, additionally cyclosporin was tested at a concentration of 10 μM, and probenecid at 5 mM in mice. Figure 6B illustrates the effects of the four different inhibitors on the mixture-evoked response in the rat septum. In these recordings verapamil, probenecid and MK reduced the peak amplitude to between 40–52%, while cyclosporin had no measurable effect. Similar reductions of amplitude but with varying degree of inhibitions were observed with all other stimuli, also in rat turbinates and mouse septum. The effects were reversible after initial reduction as peak amplitudes were restored to 50–100 % after washout of the inhibitor.

Because the absolute magnitude of a response to a stimulus varied between different preparations and specimens, the amplitude of each stimulus was normalized to its control response before inhibitor application. The averaged normalized amplitudes in the

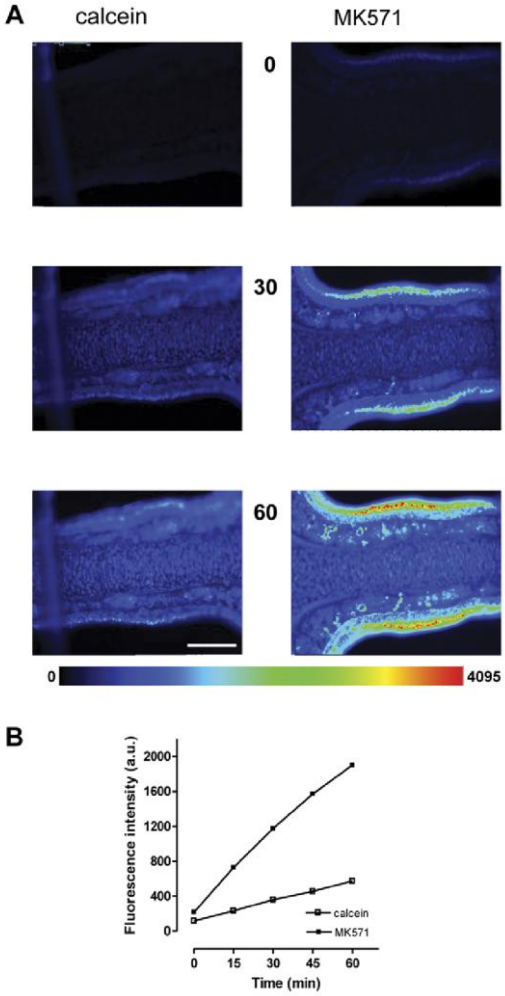


Figure 2. Calcein fluorescence in olfactory slices is elevated in the presence of an MDR inhibitor. A: Time series images in pseudocolor of two individual mouse olfactory slices incubated with 1 μM calcein–AM (left panel), or concomitantly with 25 μM MK571 (right panel). The numbered images correspond to individual frames at indicated time points. Some pixel saturation occurred at the 60 min time point in the center portion of the OE in MK-treated slice. The two slices are from the same specimen, recorded with identical exposure times. **B:** Time-dependent accumulation of fluorescence intensity (arbitrary units, a.u) for calcein in the absence or presence of 25 μM MK571 as evaluated from regions of interest (ROIs), saturated pixels were not considered for evaluation. Data derived from above experiment. Values of the pseudocolor code bar scales from 0 (low, blue) to 4095 (high, red), scale bar in A = 200 μm.
doi:10.1371/journal.pone.0036167.g002

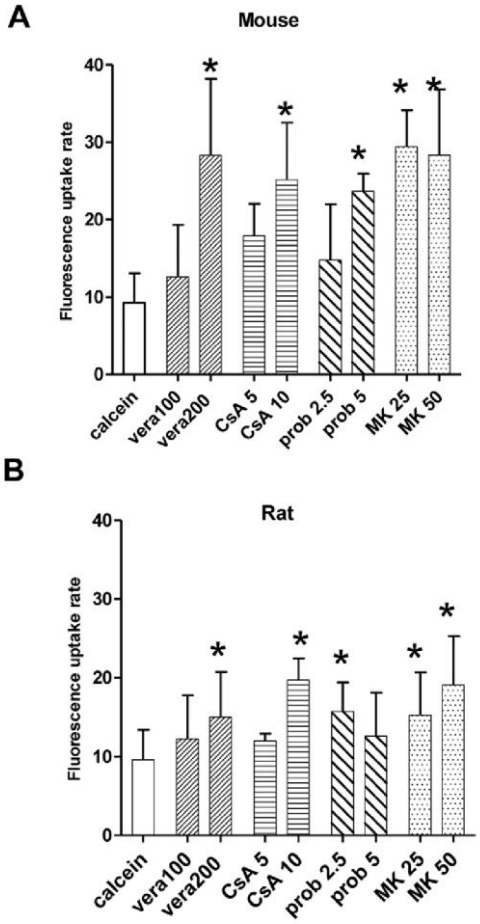


Figure 3. Effect of various MDR inhibitors on calcein accumulation in olfactory slices of rat and mouse. Olfactory tissue slices were incubated with 1 μM calcein-AM in the absence or presence of the specific MDR inhibitors. Bars represent average accumulation rates as determined from slopes over all time points of the experiment, in (**A**) from mice, and in (**B**) from rats. The following inhibitors were tested: vera = verapamil at 100 and 200 μM, CsA = cyclosporin A at 5 and 10 μM, prob = probenecid at 2.5 and 5 mM, and MK = MK571 at 25 and 50 μM. Values from at least three independent assays for each inhibitor and concentration. * $p<0.05$.
doi:10.1371/journal.pone.0036167.g003

presence of the four tested MDR inhibitors were compared in Figure 7. In general KCl responses were less sensitive to all tested inhibitors independent of the recording site. Verapamil (200 μM) had a moderate decreasing effect on all responses in rat and mice, but this was not consistently significant, only for isomayl acetate and 2,5-dimethyl pyrazine in the rat septum and turbinate. In the mouse septum only the response to the mixture and 2,5-dimethyl pyrazine was significantly decreased. The presence of 5 μM cyclosporin decreased slightly the response amplitudes in all three recording sites, but the effect was not significant. Increasing its concentration to 10 μM (n = 2) remained also without significant effect. Of the four compounds tested, the MRP specific inhibitors MK571 and probenecid introduced the strongest reduction. The responses to all stimuli in all three recording sites were dramatically and significantly reduced by MK (52–94 %) at a concentration of 25 μM. Probenecid at 2.5 mM caused similar significant reductions in all responses in rat but was less effective in

X

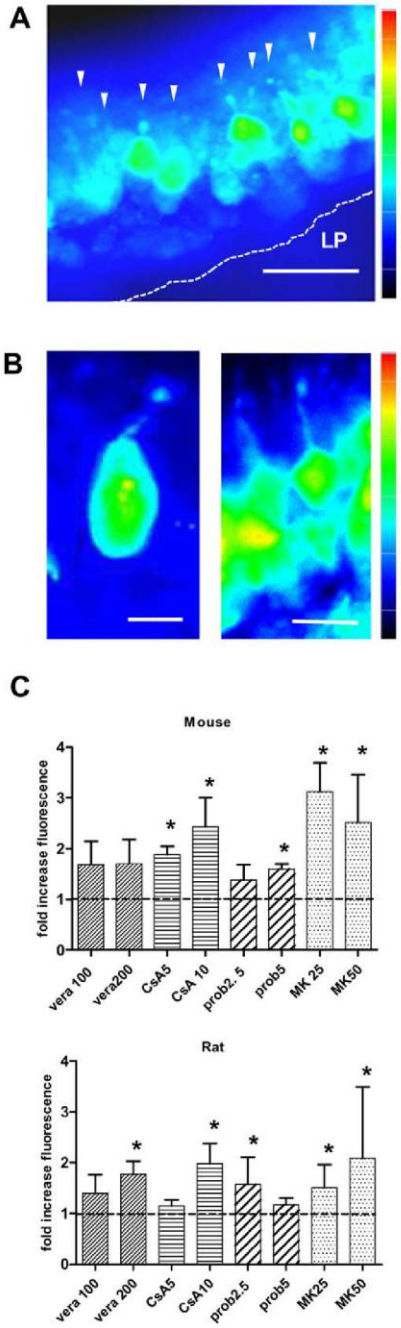


Figure 4. MDR inhibitors enhanced calcein accumulation in olfactory receptor neurons (ORNs) of mouse and rat. A: Pseudocolored fluorescence micrograph of a part of an olfactory slice from rat in the presence of MK571 (50 μM) at the 60 min time point. Arrowheads point to ORNs appearing as pear-shaped cells with visible knob-bearing dendritic structures. Fluorescence image adjusted for contrast, pseudocolor bar scales from low (blue) to high (red) intensities. LP = lamina propria, scale bar in A = 20 μm. **B:** Fluorescence scaling is different for the two images, the value of the pseudocolor bar scales 0 to 1500 for the left panel and micrograph of a single mouse ORN in the presence of calcein-AM (left panel) and a row of ORNs in the presence of cyclosporin A (right panel). Both images are taken at the 60 min time point. Note, that the 0 to 4095 for the right panel. Scale bar in the left panel = 5 μm, and 10 μm in the right panel. **C:** Intracellular inhibitor-dependent increase in fluorescence intensities was evaluated from regions of interest (ROIs) placed over the cell bodies of ORNs at the 60 min time point. Bars represent the averaged inhibitor-to-control ratios of calcein fluorescence intensities in mouse (upper panel) and rat (lower panel) for four tested inhibitors: vera = verapamil at 100 and 200 μM, CsA = cyclosporin A at 5 and 10 μM, prob = probenecid at 2.5 and 5 mM, and MK = MK571 at 25 and 50 μM. * $p<0.05$.
doi:10.1371/journal.pone.0036167.g004

mouse EOGs. While a strong effect was already observed at 2.5 mM probenecid in mouse EOG responses, 5 mM were required for a reduction of 85 to 95% for all stimuli-induced responses.

To uncover disparities in the shape of EOG waveforms, we normalized all recordings to their peak amplitudes, superimposed and aligned them on their onset. A representative sample is shown in Figure 8 for the effect of the four tested MDR-inhibitors on the averaged mixture-induced responses in the rat septum. Inspection of the superposition of all 108 pairs (9 pairs/ inhibitor/ recording site, n = 4) did not reveal any distortion of the general aspect of the waveform, but subtle differences in activation kinetic. In approximately 65% (61/93) of the inhibitor-control pairs the time course of the rising phase was nearly identical and did overlap to almost 100 %, the remaining 35 % showed a shift to slower rise times. We further analyzed the rates of rise by fitting the normalized responses to a sigmoidal curve (not shown) and measured the half-maximal activation (V_{50}). Although the shift to slower rise times was present in all of these recordings, it was statistically not significant. To compare decay kinetics waveforms of inhibitor-control pairs were aligned on their peak amplitude and the overlays inspected for differences. Decay kinetics were not systemically affected. In 40/90 waveform pairs no change occurred, while 35/90 had slightly slower and 15/90 faster decay kinetics, although there was a tendency for verapamil and probenecid to show faster decay kinetics on the rat septum. This was independent of stimuli or inhibitor used. Though the peak amplitudes of the voltage responses were different, the overall shape of the waveform was only modestly changed or stayed comparable to that of the control.

Discussion

The results of our study demonstrate MDR transporter activities in the olfactory epithelium and provide comparative data on the function of Ppg and MRP transporters for two animal species, the mouse and the rat. Using a fluorometric assay in combination with pharmacological inhibitors we show that both transporters are functional in the olfactory epithelium, and moreover in olfactory neurons. Electrophysiological recordings from the OE indicated that the response to odorants was reduced when MDR activity was inhibited thus revealing their activity.

Functional assays to detect MDR transporter activity involve the use of fluorescent transporter substrates such as calcein-AM [26,27]. While typically the fluorescent assay is used for detection of MDR transporters in MDR overexpressing cells, the assay has already been proven to be suitable in physiological acute slice preparations of rodent taste cells and *Xenopus* olfactory epithelium [21,28]. The assay is based on the principle that active MDR

Table 1. Primer pairs used for the amplification of cDNAs for rat and mouse Mdrs and Mrps.

	Rat			
Gene		**Primer (5′-3′)**	**Genbank Accession No**	**Amplicon (bp)**
MRP1 (Abcc1)	forward	ATGTGACTCTCAAGGGCTCCGTGG	NM_022281	691
	reverse	GTGCTGCTGTGCTGCTGGTTAGTA		
MDR1a (Abcb1a)	forward	GAGTGAAAAGGTCGTCCAGGAAGCG	NM_133401	234
	reverse	TCTCGCATGGTCACAGTTCATGAGC		
MDR1b (Abcb1b)	forward	CCCAAAGTGACACTGGTGCCTCTG	NM_012623	564
	reverse	GCCTGGAGCCCATAGCCCCTTTA		
Cyclophilin A (CypA)	forward	TGGCACTGGTGGCAAGTCCA	NM_017101	229
	reverse	TGGACCCAAAACGCTCCATGGC		
	Mouse			
Gene		**Primer (5′-3′)**	**Genbank Accession No**	**Amplicon (bp)**
MRP1 (Abcc1)	forward	AGCATTGTGCAGGCCAGCGT	NM_008576.3	822
	reverse	CTCCGAGGCCAGGTCCTGCT		
MDR1a (Abcb1a)	forward	CCTGAAACCCAGCGGCAGAACA	NM_011076.3	265
	reverse	GCCTAGACCCTGTAGCCCCTTTCAC		
MDR1b (Abcb1b)	forward	GTGTCCACAGAAAGCAAGACCAAGA	NM_011075.3	482
	reverse	GGCGCCCATCGCCCCTTTAA		
Cyclophilin A (CypA)	forward	CATCCTAAAGCATACAGGT	NM_008907	165
	reverse	TCCATGGCTTCCACAATGTT		

doi:10.1371/journal.pone.0036167.t001

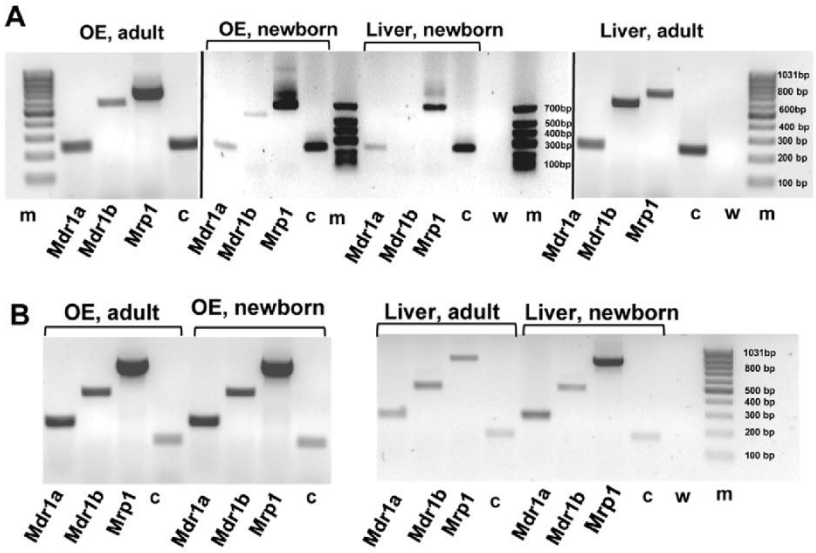


Figure 5. Distribution of mdr and mrp mRNAs in rat and mouse olfactory and liver tissue. The presence of *mdr1a*, *mdr1b* and *mrp1* mRNA analyzed by means of RT-PCR from samples of olfactory mucosa and liver tissue. Electrophoresis of PCR products **A:** from newborn and adult rat, **B:** from newborn and adult mouse. The cDNAs were amplified with rat- and mouse-specific primers for the Mdr1a, Mdr1b and Mrp1 genes. All tissues were positive for the tested cDNAs (note that staining in A, lane 12 for *mdr1b* is weak, but visible on the gel). c = cyclophilin A used as positive control, w = negative control containing water in place of cDNA, m = DNA size markers. All gels were run together except for the newborn rat, which was run on a separate gel. Results from a single experiment.
doi:10.1371/journal.pone.0036167.g005

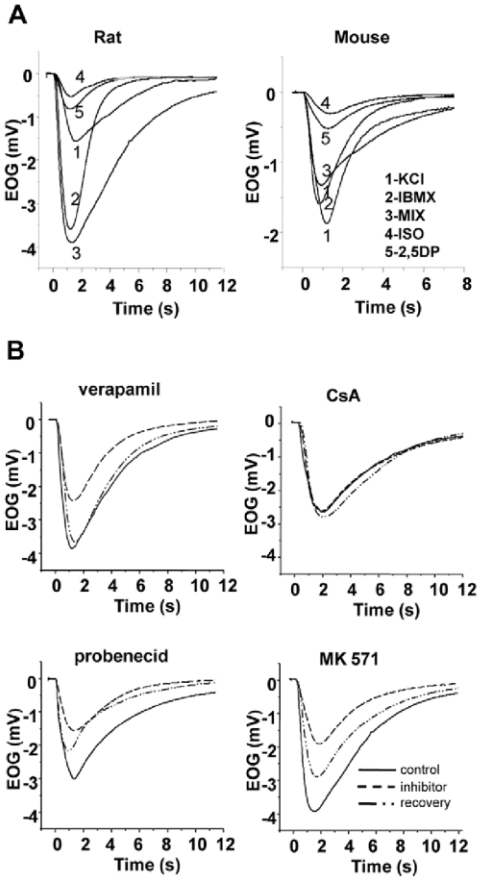


Figure 6. Modulatory effect of MDR inhibitors on the olfactory response to odorants in rat and mouse. A: Representative superimposed electroolfactogram traces recorded in the septal olfactory mucosa of a rat (left) and a mouse (right) under control conditions. Responses are recorded to a sequence of stimuli (inset, left) as KCl, IBMX, a mixture of odorants, isoamyl acetate and 2,5-dimethyl pyrazine, at concentrations of 10^{-4} M. **B:** Representative selection of EOG recordings from rats in response to the mixture at a concentration of 10^{-4} M before (control, solid line), during (inhibitor, dashed line), and after (recovery, dot-dash line) application of four MDR inhibitors: verapamil at 200 µM, cyclosporin A (CsA) at 5 µM, probenecid at 2.5 mM and MK571 at 25 µM. Recordings are from four different specimen.
doi:10.1371/journal.pone.0036167.g006

transporters will restrict calcein accumulation in the tissue where they reside resulting in low fluorescence. This activity can be reversed in the presence of specific inhibitors thus enhancing fluorescence intensity. Our functional studies show that calcein accumulation in rodent OE is significantly enhanced in the presence of potent Pgp and MRP inhibitors. To increase the probability of detecting transporter activity, two pairs of structurally diverse inhibitors were selected appropriate to the transporter type. The calcein fluorescence readily developing in the OE in the absence of any of the selected inhibitors argued, in a first instance, against a functional expression of MDR transporters in the OE. But all four selected inhibitors, however, significantly increased calcein fluorescence in the OE in a time- and concentration-dependant manner, thereby revealing similar inhibitor profiles for both animal species with small differences in sensitivity among them with probenecid being already saturated at the lower concentration. To make appropriate interpretation of inhibitor interaction data the specificity of the inhibitors has to be considered. The Pgp inhibitors cyclosporin and verapamil have been proven to be reversing agents in 'physiological' sensory cells [21,28] and in cells transiently transfected with Pgp [7]. In a large *in vitro* study on recommendation for inhibitor/probe use, cyclosporin and verapamil have been classified as good Pgp inhibitors [29]. Considering that verapamil is a known calcium channel blocker, it may or may not exert this function in the calcein-AM assay as calcein fluorescence is insensitive to changes in cytosolic calcium [30]. MK571 has been previously defined as a specific blocker of MRP1 [31] but also inhibits other MRP species. Probenecid is an inhibitor of organic anion transporters acting on MRP isoforms other than MRP1, but not on Pgp [32]. Other members of the MRP family as MRP4 are expressed [14] and MRP3 and MRP5 has been recently histochemically localized in rat olfactory receptor neurons [33]. MRP5 activity cannot be assessed with the assay used here as calcein is not a substrate [34], but we cannot exclude that MRP3 or MRP4 activity may contribute to calcein accumulation in our experiment. Assuming a high specificity of the selected inhibitors the increased calcein accumulation/retention is brought about by the activity of Pgp and MRP1 and/or MRP-like transporters. Both transporters, functional in the OE of newborn rodents, behaved in a similar manner in each species.

The most striking result of the present study was the modulation of MDR activity in single ORNs. Microscopical examination at the 60 min time point allowed to unambiguously identifying ORNs by their distinctive and unmistakable morphology in contrast to the more undescriptive sustentacular cells. Calcein uptake curves for all inhibitors tested were nearly linear over 60 min of experiments thus allowing for evaluation of calcein accumulation at the 60 min end-point. Cellular accumulation of calcein by Pgp or MRP inhibition was associated with an inhibitor-induced increase in fluorescence within single ORNs and comparison between single ORN and tissue fluorescence intensities revealed qualitative similarities in inhibitor profile. These findings suggest a functional activity of the two transporter systems in single rodent ORNs. Very similar results have been obtained for larval *Xenopus* ORNs [21]. Further support to our findings comes from immunolocalization and antisense signaling of MRP1 [14,19] both reporting the presence of MRP1 mRNA in ORNs of adult rat. More intriguing is the finding that MRP1 is most likely expressed in olfactory cilia of rats [35], the site where initial olfactory transduction takes place. In contrast to the presence of MRP1, no Pgp immunological expression is reported for rat olfactory mucosa. In a recent immunohistological study Thiebaud et al. [33] localized Ppg expression only to a vessel in the submucosa. The discrepancy may be explained by the method as the calcein–AM staining method is more sensitive than immunostaining. Then again, evidence based on an immunohistochemistry with the antibody C219, as used by [33] is very often compromised in paraffin and/or formalin treated tissue [36,37]. For immunolocalization of Pgp often various fixation conditions and different antibodies are required as shown for rat taste buds or hippocampus neurons of rat [28,38].

Reports on localization or activity of MDR transporters in normal physiological neurons are yet scarce. Normally present in transport epithelia these MDR transporters are almost considered

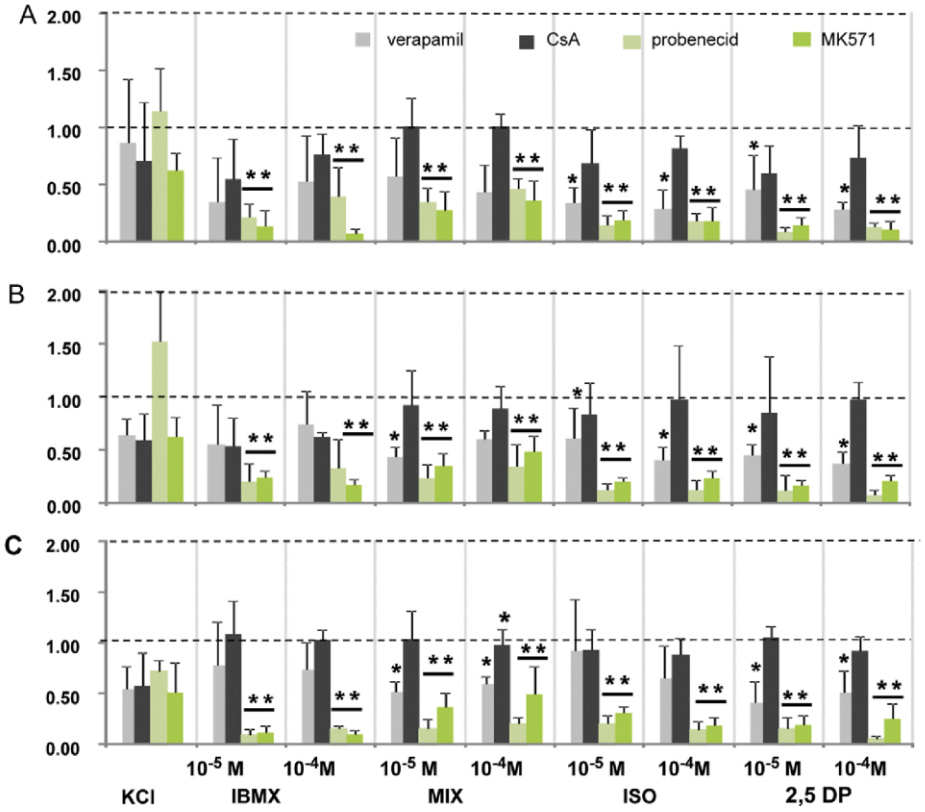


Figure 7. Summary of the modulatory effects of four MDR inhibitors on olfactory response amplitudes. A: in the rat olfactory septum, **B:** in the rat turbinate, and **C:** in the mouse olfactory septum. Bars represent normalized average peak amplitudes. Responses were normalized with respect to control before inhibitor application which was set to unity. The following stimuli were sequentially applied in control condition and in presence of the specified inhibitor: KCl, IBMX, a mixture of odorants (MIX), isoamyl acetate (ISO), and 2,5-dimethyl pyrazine (2,5DP), at the indicated concentrations. The inhibitors tested were verapamil at 200 µM (gray), cyclosporin A at 5 µM (black), probenecid at 2.5 mM, (light green) and MK571 at 25 µM (green). Note that for the mouse (in C) the results for 5 mM probenecid are shown. **$p<0.001$, * $p<0.05$.
doi:10.1371/journal.pone.0036167.g007

ectopical in neurons, this means occurring in an unusual place. RT-PCR analysis of rat brains revealed the neuronal expression of MRP1, MRP3, MRP4 and MRP5 [39,40]. Pgp also has been localized to a specific neuronal cell type in the hippocampus of mice [41]. More interestingly, both genes, *mdr1a and b*, were transiently overexpressed in hippocampus neurons after a pathological situation with insult [42] pointing to a role of Pgp in neuroprotection.

Immunofluorescence labeling localized MRP1 to the sustentacular cell layer of the rat OE [19] and it would have been of special interest to assess MDR functionality in the whole sustentacular cellular layer. This band is only 6–9 µm small and the sustentacular cells are less contoured than ORNs. As they are intermingled with the ORNs, we have rarely been able to identify them unambiguously but for cyclosporin and MK end-point fluorescence intensities. The sustentacular cells show comparable fluorescence intensities to ORNs, and MK appears to have the largest inhibitory effect. This suggests that both cell types, ORNs and sustentacular cells, contributed to the overall fluorescence in the OE measured in presence of Pgp or MRP inhibitors.

To obtain evidence that the functionally detected transporters are expressed in OE, RT–PCR analysis was performed. Recent studies have detected the presence of mRNA of MRP1, MRP3, MRP4, and MRP5 in adult rat OE [14,19,20,33], but no data are avaible for the OE of mouse or newborn rodents. Our RT-PCR results show that both Pgp encoding genes *mdr1a* and *mdr1b* as well MRP1 are expressed in OE of newborn and adult animals of both species. Despite of differences in the tissue source, this is in agreement with previous results for adult rat OE reported by other authors [14,19,20]. The aforementioned investigations included olfactory endoturbinates or used endoturbinates exclusively [20] (personal communication) as olfactory tissue source. As turbinates contain significant amounts of contaminating respiratory cells [43] we exclusively sampled olfactory tissue to perform RT-PCR. Thus the presented results on *mdr1a*, *mdr1b* and MRP1 expression are olfactory tissue-specific for newborn and adult rat and mouse. The perinatal expression pattern of Pgp isoforms and MRP1 does not undergo changes with postnatal maturation as we find all three MDR transporters expressed in adult animals of both species. We do not know, however, if the level of expression is increased during

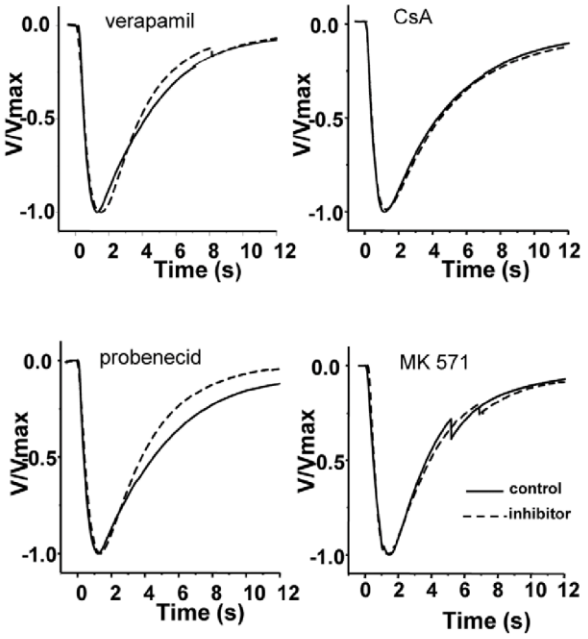


Figure 8. Comparison of the kinetics of olfactory responses during inhibitor application. Representative electroolfactogram (EOG) traces from rat in response to the odorant mixture of 10^{-4} M before and during MDR inhibitor application. EOG traces were normalized to their maximum amplitude and averaged for the comparison of their time course. Inhibitors applied were verapamil at 200 μM, CsA = cyclosporin A at 5 μM, probenecid at 2.5 mM, and MK571 at 25 μM. Each averaged waveform represents the independent assessment from four different animals.
doi:10.1371/journal.pone.0036167.g008

postnatal maturation as our RT-PCR was only qualitative. Physiological modulation during ontogenesis can be hypothesized for these proteins in OE similar to that during mouse and rat brain maturation [44–46]. Our results corroborate the results obtained with the functional assay. Both transporters have been fully functional early at birth as the calcein-AM assay has been performed on animals at the day of birth.

If Pgp and MRP transporters are functional in ORNs and in the OE, would their presence contribute to the physiological activity of ORNs, namely to the response to odorants? Comparison of the EOGs and their kinetics provide valuable information about how modifications or experimental manipulations influence the signaling underlying the ORNs response to odorants. We analyzed responses to single odorants and to an odorant mixture exciting a large receptor population. We included two stimuli, KCl and IBMX, which elicit EOGs not mediated by olfactory receptor activation. The elevated KCl response is a measure of general OE excitability, and IBMX, a phosphodiesterase inhibitor leads to an increase in ciliary cAMP thus activating the downstream signal transduction cascade.

Inactivation or reversal of Pgp and MRP function by appropriate inhibitors was associated with a significant reduction in EOG amplitude. Verapamil-mediated Pgp inhibition reduced the amplitude of most odorant responses without significantly affecting the amplitude of IBMX and KCl, indicating the functioning of the cAMP signaling pathway. Based on this observation one may hypothesize that Pgp may be interfering directly with odorants or that interaction takes place at or close to the olfactory receptor site. Other than as for Pgp dependant interaction, the result can be interpreted by virtue of the quality of verapamil as a blocker of voltage-activated calcium channels. The localization of the cellular interaction of the transporters and/or inhibitors with the odorant response can be inferred from the EOG recordings. EOGs record generator potentials which arise mostly in the ciliary parts of the ORNs where the signal transduction process occurs. Contribution may also come from the knob and the upper dendritic part of the ORN. As cilia do not contain voltage-activated channels [47] the lipophilic verapamil has to partition into the knob where L-type calcium channels are localized [48]. They may open in response to odorants and be closed by verapamil thus reducing the EOG amplitude. The Pgp inhibitor cyclosporin only slightly reduced EOG amplitudes indicating no significant interaction with odorant induced events. This is in contrast to its strong inhibitory effect evidenced in the calcein assay. There are two principle differences in the two preparations which could account for this: e.g. the effect may depend on the availability of the inhibitor at its target site. Other than in the calcein assay where cells have been almost directly exposed to the inhibitors, in the EOG experiments they have first to travel across an aqueous layer of mucus to diffuse to their site of action. Different physicochemical properties could influence their passage. A more important difference is that not calcein-AM is the substrate but an unknown Pgp-target molecule. There, inhibitory effects may depend on the combination of transporter-substrate-inhibitor and react differently in diverse assays. Although cyclosporin and verapamil bind with high affinity to Pgp [49,50] their interaction with Pgp differ [51,52]. It is also possible that the anatomical localization of Pgp transporters is far from the site of

signal transduction, not allowing interaction or electrophysiological EOG recording. Regarding the discrepancies and the lack of specific cyclosporin- and verapamil-mediated effects, it remains unclear if the Pgp transporter is involved in the early part of the olfactory response. To clarify this, further investigations are needed.

Blockade of MRP function by probenecid or MK571 strongly decreased and almost abolished EOG amplitudes of the odorant and IBMX-induced responses. The fact that IMBX-induced responses have also been reduced by MRP inhibitors suggests that the interaction between MRP and/or inhibitors does not occur at the receptor site. One has to consider whether any of the inhibitors may have an effect on EOGs by interacting with one of the elements in the signal transduction chain. Recently. Xie et al, [53] demonstrated that MRP4 inactivation by MK571 and probenecid is associated with reduced cAMP degradation by cellular phosphodiesterases. According to their model, both MK and probenecid acted as phosphodiesterase inhibitors in various MRP4 expressing cell lines. MRP4 and MRP5 are transporters associated with the efflux of cyclic nucleotides like cAMP and cGMP from cells [54,55]. In ORNs, cAMP has a crucial role in signal transduction and its level is tightly regulated by rapid degradation of phosphodiesterases. Given that MK and probenecid may block phosphodiesterases activity in ORNs this would be similar to a functional ablation of their activity. This effect has been studied in a mouse line with gene disruption for both subtypes of phosphodiesterases identified in ORNs [56]. Contrary to the assumption that the resulting increase in cAMP would lead to an augmentation of the olfactory response, odorant-induced EOGs exhibited significant reduced amplitudes. Also the unspecific phosphodiesterase blocker IBMX reduced odorant–induced current amplitudes in single ORNs when IBMX was applied together with odorants [57]. Such mechanisms of action could explain the reduced EOG amplitudes recorded in presence of MK and probenecid. It is not known if the model of Xie et al. can be extended to other MRPs than to MRP4, and which of the MRPs in ORNs would participate in this process. Our calcein assay does not provide information to which of the MRP isoforms is involved in the fluorescence uptake. Possible contribution may come from MRP1, MRP3, MRP4 or MRP5. While calcein is not a substrate of MRP5, MRP5 activity may be inhibited by MK and probenecid as shown for human MRP5 [58].

There is no simple interpreation to explain such changes in a system where the measured response is the result of complex pathways and feedback mechanisms. Reduced EOG amplitudes are compatible with a faster response termination. The most compatible explanation may be that MRP-like MDR transporters interact with mechanisms in the calcium signaling network. Calcium plays a pivotal role as a third messenger in olfactory transduction and can either potentiate or attenuate the olfactory signal [59]. Calcium can also modulate receptors and reduce olfactory sensitivity [60].

Together, the data presented here have shown that MDR transporters are functional in OE and in ORNs of rodents. They also show how sensory responses to odorants were altered by inactivation/inhibition of MDR function, especially by inhibition of MRP-like transporters. Among proposed functional roles tissue detoxification may be a vital element especially with the olfactory epithelium being the principal site of absorption of inhaled compounds. The interaction of natural and environmental cytotoxic compounds with ABC transporter have been documented in several studies [3,61]. Inhibition or inactivation of MDR transporters may lead to reduced acuity and in turn modify animal behavior. Besides being detrimental and health threatening to the animal, it may also be beneficial as a continuous exposure may induce up-regulation of the transporters in the olfactory tissue [20]. There is also growing evidence of pheripheral modulation of olfactory signals by input from autonomic innervations by neurotransmitters [62]. MDRs may contribute to uptake and efflux of such substances i.e. adrenaline which modulates signal activities in the olfactory epithelium [63] may be transported by MRP1 as shown for other tissue [64].

Acknowledgments

We thank Dr. Claire Fenech for expert advice with the RT-PCR and critically reading the manuscript, Dr. Volkert Breuninger for valuable discussions, and Peter Forbes for help with the English.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AM IJ. Performed the experiments: AM. Analyzed the data: AM IJ. Wrote the paper: GS IJ.

References

1. Juliano RL, Ling V (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta 455: 152–162.
2. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, et al. (1992) Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science 258: 1650–1654.
3. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2005) Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicol Appl Pharmacol 204: 216–237.
4. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, et al. (1987) Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 7735–7738.
5. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, et al. (1989) Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. Proc Natl Acad Sci U S A 86: 695–698.
6. Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, et al. (1996) Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol 148: 1237–1247.
7. Chen Y, Simon SM (2000) In situ biochemical demonstration that P-glycoprotein is a drug efflux pump with broad specificity. J Cell Biol 148: 863–870.
8. Bakos E, Homolya L (2007) Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). Pflugers Arch 453: 621–641.
9. Steinke A, Meier-Stiegen S, Drenckhahn D, Asan E (2008) Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and fila. Histochem Cell Biol 130: 339–361.
10. Nef P, Heldman J, Lazard D, Margalit T, Jaye M, et al. (1989) Olfactory-specific cytochrome P-450. cDNA cloning of a novel neuroepithelial enzyme possibly involved in chemoreception. J Biol Chem 264: 6780–6785.
11. Thornton-Manning JR, Dahl AR (1997) Metabolic capacity of nasal tissue interspecies comparisons of xenobiotic-metabolizing enzymes. Mutat Res 380: 43–59.
12. Heydel JM, Holsztynska EJ, Legendre A, Thiebaud N, Artur Y, et al. (2010) UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: expression, regulation, and function. Drug Metab Rev 42: 74–97.
13. Wioland MA, Fleury-Feith J, Corlieu P, Commo F, Monceaux G, et al. (2000) CFTR, MDR1, and MRP1 immunolocalization in normal human nasal respiratory mucosa. J Histochem Cytochem 48: 1215–1222.
14. Genter MB, Krishan M, Augustine LM, Cherrington NJ (2010) Drug transporter expression and localization in rat nasal respiratory and olfactory mucosa and olfactory bulb. Drug Metab Dispos 38: 1644–1647.
15. Kleene SJ (2008) The electrochemical basis of odor transduction in vertebrate olfactory cilia. Chem Senses 33: 839–859.
16. Reisert J, Zhao H (2011) Perspectives on: information and coding in mammalian sensory physiology: response kinetics of olfactory receptor neurons and the implications in olfactory coding. J Gen Physiol 138: 303–310.
17. Graff CL, Pollack GM (2005) Functional evidence for P-glycoprotein at the nose-brain barrier. Pharm Res 22: 86–93.
18. Kandimalla KK, Donovan MD (2005) Localization and differential activity of P-glycoprotein in the bovine olfactory and nasal respiratory mucosae. Pharm Res 22: 1121–1128.

19. Kudo H, Doi Y, Fujimoto S (2010) Expressions of the multidrug resistance-related proteins in the rat olfactory epithelium: a possible role in the phase III xenobiotic metabolizing function. Neurosci Lett 468: 98–101.
20. Thiebaud N, Sigoillot M, Chevalier J, Artur Y, Heydel JM, et al. (2010) Effects of typical inducers on olfactory xenobiotic-metabolizing enzyme, transporter, and transcription factor expression in rats. Drug Metab Dispos 38: 1865–1875.
21. Manzini I, Schild D (2003) Multidrug resistance transporters in the olfactory receptor neurons of Xenopus laevis tadpoles. J Physiol 546: 375–385.
22. Hollo Z, Homolya L, Davis CW, Sarkadi B (1994) Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter. Biochim Biophys Acta 1191: 384–388.
23. Feller N, Broxterman HJ, Wahrer DC, Pinedo HM (1995) ATP-dependent efflux of calcein by the multidrug resistance protein (MRP): no inhibition by intracellular glutathione depletion. FEBS Lett 368: 385–388.
24. Chen S, Lane AP, Bock R, Leinders-Zufall T, Zufall F (2000) Blocking adenylyl cyclase inhibits olfactory generator currents induced by "IP(3)-odors". J Neurophysiol 84: 575–580.
25. Motulsky H (2010) Intuitive Biostatistics. USA: Oxford University Press. pp 237–240.
26. Feller N, Kuiper CM, Lankelma J, Ruhdal JK, Scheper RJ, et al. (1995) Functional detection of MDR1/P170 and MRP/P190-mediated multidrug resistance in tumour cells by flow cytometry. Br J Cancer 72: 543–549.
27. Dogan AL, Legrand O, Faussat AM, Perrot JY, Marie JP (2004) Evaluation and comparison of MRP1 activity with three fluorescent dyes and three modulators in leukemic cell lines. Leuk Res 28: 619–622.
28. Jakob I, Hauser IA, Thevenod F, Lindemann B (1998) MDR1 in taste buds of rat vallate papilla: functional, immunohistochemical, and biochemical evidence. Am J Physiol 274: C182–191.
29. Rautio J, Humphreys JE, Webster LO, Balakrishnan A, Keogh JP, et al. (2006) In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates. Drug Metab Dispos 34: 786–792.
30. Lebedeva IV, Pande P, Patton WF (2011) Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. PLoS One 6: e22429.
31. Gekeler V, Ise W, Sanders KH, Ulrich WR, Beck J (1995) The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. Biochem Biophys Res Commun 208: 345–352.
32. Gollapudi S, Kim CH, Tran BN, Sangha S, Gupta S (1997) Probenecid reverses multidrug resistance in multidrug resistance-associated protein-overexpressing HL60/AR and H69/AR cells but not in P-glycoprotein-overexpressing HL60/Tax and P388/ADR cells. Cancer Chemother Pharmacol 40: 150–158.
33. Thiebaud N, Menetrier F, Belloir C, Minn AL, Neiers F, et al. (2011) Expression and differential localization of xenobiotic transporters in the rat olfactory neuro-epithelium. Neurosci Lett 505: 180–185.
34. McAleer MA, Breen MA, White NL, Matthews N (1999) pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. J Biol Chem 274: 23541–23548.
35. Mayer U, Kuller A, Daiber PC, Neudorf I, Warnken U, et al. (2009) The proteome of rat olfactory sensory cilia. Proteomics 9: 322–334.
36. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, et al. (1989) Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. J Histochem Cytochem 37: 159–164.
37. Cordon-Cardo C, O'Brien JP, Boccia J, Casals D, Bertino JR, et al. (1990) Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. J Histochem Cytochem 38: 1277–1287.
38. Volk H, Potschka H, Loscher W (2005) Immunohistochemical localization of P-glycoprotein in rat brain and detection of its increased expression by seizures are sensitive to fixation and staining variables. J Histochem Cytochem 53: 517–531.
39. Hirrlinger J, Konig J, Dringen R (2002) Expression of mRNAs of multidrug resistance proteins (Mrps) in cultured rat astrocytes, oligodendrocytes, microglial cells and neurones. J Neurochem 82: 716–719.
40. Falcao AS, Bellarosa C, Fernandes A, Brito MA, Silva RF, et al. (2007) Role of multidrug resistance-associated protein 1 expression in the in vitro susceptibility of rat nerve cell to unconjugated bilirubin. Neuroscience 144: 878–888.
41. Karssen AM, Meijer O, Pons D, De Kloet ER (2004) Localization of mRNA expression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier and in the hippocampus. Ann N Y Acad Sci 1032: 308–311.
42. Volk HA, Burkhardt K, Potschka H, Chen J, Becker A, et al. (2004) Neuronal expression of the drug efflux transporter P-glycoprotein in the rat hippocampus after limbic seizures. Neuroscience 123: 751–759.
43. Strotmann J, Breer H (1991) Generation of monoclonal antibodies detecting specific epitopes in olfactory and respiratory epithelia. Cell Tissue Res 266: 247–258.
44. Schiengold M, Schwantes L, Schwartsmann G, Chies JA, Nardi NB (2001) Multidrug resistance gene expression during the murine ontogeny. Mech Ageing Dev 122: 255–270.
45. Tsai CE, Daood MJ, Lane RH, Hansen TW, Gruetzmacher EM, et al. (2002) P-glycoprotein expression in mouse brain increases with maturation. Biol Neonate 81: 58–64.
46. Rosati A, Maniori S, Decorti G, Candussio L, Giraldi T, et al. (2003) Physiological regulation of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and cytochrome P450 3A2 during rat ontogeny. Dev Growth Differ 45: 377–387.
47. Leinders-Zufall T, Rand MN, Shepherd GM, Greer CA, Zufall F (1997) Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics. J Neurosci 17: 4136–4148.
48. Gautam SH, Otsuguro KI, Ito S, Saito T, Habara Y (2007) T-type Ca2+ channels mediate propagation of odor-induced Ca2+ transients in rat olfactory receptor neurons. Neuroscience 144: 702–713.
49. Safa AR (1988) Photoaffinity labeling of the multidrug-resistance-related P-glycoprotein with photoactive analogs of verapamil. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 7187–7191.
50. Foxwell BM, Mackie A, Ling V, Ryffel B (1989) Identification of the multidrug resistance-related P-glycoprotein as a cyclosporine binding protein. Mol Pharmacol 36: 543–546.
51. Broxterman HJ, Pinedo HM, Schuurhuis GJ, Lankelma J (1990) Cyclosporin A and verapamil have different effects on energy metabolism in multidrug-resistant tumour cells. Br J Cancer 62: 85–88.
52. Litman T, Skovsgaard T, Stein WD (2003) Pumping of drugs by P-glycoprotein: a two-step process? J Pharmacol Exp Ther 307: 846–853.
53. Xie M, Rich TC, Scheitrum C, Conti M, Richter W (2011) Inactivation of multidrug resistance proteins disrupts both cellular extrusion and intracellular degradation of cAMP. Mol Pharmacol 80: 281–293.
54. Jedlitschky G, Burchell B, Keppler D (2000) The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. J Biol Chem 275: 30069–30074.
55. Wielinga PR, van der Heijden I, Reid G, Beijnen JH, Wijnholds J, et al. (2003) Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. J Biol Chem 278: 17664–17671.
56. Cygnar KD, Zhao H (2009) Phosphodiesterase 1C is dispensable for rapid response termination of olfactory sensory neurons. Nat Neurosci 12: 454–462.
57. Firestein S, Darrow B, Shepherd GM (1991) Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. Neuron 6: 825–835.
58. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, De Haas M, Van Deemter L, et al. (2003) Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. Mol Pharmacol 63: 1094–1103.
59. Matthews HR, Reisert J (2003) Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation. Curr Opin Neurobiol 13: 469–475.
60. Hegg CC, Greenwood D, Huang W, Han P, Lucero MT (2003) Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. J Neurosci 23: 8291–8301.
61. Buss DS, Callaghan A (2008) Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: A survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance. Pesticide Biochemistry and Physiology 90: 141–153.
62. Hall RA (2011) Autonomic modulation of olfactory signaling. Sci Signal 4: pe1.
63. Kawai F, Kurahashi T, Kaneko A (1999) Adrenaline enhances odorant contrast by modulating signal encoding in olfactory receptor cells. Nat Neurosci 2: 133–138.
64. Costa VM, Ferreira LM, Branco PS, Carvalho F, Bastos ML, et al. (2009) Cross-functioning between the extraneuronal monoamine transporter and multidrug resistance protein 1 in the uptake of adrenaline and export of 5-(glutathion-S-yl)adrenaline in rat cardiomyocytes. Chem Res Toxicol 22: 129–135.