



HAL
open science

Rôle des interactions périphériques dans la construction de l'image sensorielle olfactive

Fouzia El Mountassir

► **To cite this version:**

Fouzia El Mountassir. Rôle des interactions périphériques dans la construction de l'image sensorielle olfactive. Psychologie. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS040 . tel-00967928

HAL Id: tel-00967928

<https://theses.hal.science/tel-00967928>

Submitted on 31 Mar 2014

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.

THÈSE
Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de la Vie

Par

Fouzia EL MOUNTASSIR

07 Novembre 2013

Rôle des interactions périphériques dans la construction de l'image sensorielle olfactive

Composition du Jury

Dr. Philippe LUCAS	UMR, Physiologie de l'Insecte Signalisation et Communication, Versailles Rapporteur
Dr. Moustafa BENSAFI	Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon Rapporteur
Dr. Patricia VIRET	Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon Examineur
Dr. Jean-Pierre ROSPARS	UMR, Physiologie de l'Insecte Signalisation et Communication, Versailles Examineur
Pr. Yves ARTUR	CSGA, Dijon Président du Jury
Dr. Anne-Marie LE BON	CSGA, Dijon Directrice de thèse
Dr. Thierry THOMAS-DANGUIN	CSGA, Dijon Co-encadrant de thèse

Remerciements

Le manuscrit qui suit est l'aboutissement de mes trois années d'études en tant que doctorante au Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation de Dijon. Je remercie l'Institut National de la Recherche Agronomique et le Conseil Régional de Bourgogne pour leur soutien financier durant ces trois années de thèse.

Je remercie Monsieur Luc Pénicaud, directeur du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, pour m'avoir accueillie au sein de l'unité et pour m'avoir permis de mener ce travail dans de très bonnes conditions.

Je remercie tout particulièrement ma directrice de thèse Anne Marie Le Bon pour avoir dirigé mon travail depuis le Master 2 et pendant mes années de thèse. Je lui suis reconnaissante de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir donné l'opportunité d'effectuer cette thèse. Merci pour ta grande disponibilité et pour tous tes précieux conseils qui m'ont permis de faire évoluer positivement mon projet professionnel.

Mes remerciements vont conjointement à mon co-directeur de thèse Thierry Thomas-Danguin pour sa gentillesse et pour l'aide qu'il m'a apportée au cours de ce travail. Son intérêt, sa disponibilité, son suivi quotidien de mes travaux et ses précieux conseils m'ont été d'un grand profit. Je le remercie infiniment.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude envers les membres du jury qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps à l'évaluation de ma thèse. Je cite en particulier Monsieur Philippe Lucas et Monsieur Moustafa Bensafi qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse. Je remercie également le Dr. Patricia Viret et le Dr. Jean-Pierre Rospars pour avoir accepté d'examiner mon rapport et pour leur participation à mon comité de thèse. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ces travaux, votre efficacité à cerner les problèmes et à fournir des propositions visant à les résoudre. Je tiens aussi à remercier le Pr. Yves Artur pour avoir accepté de présider ce jury.

Un grand merci à Christine Belloir pour m'avoir guidée tout au long des expériences d'imagerie calcique. Merci pour ton sérieux, ta motivation, ta ténacité, ta gentillesse. C'était une chance de t'avoir à mes côtés !

Un grand merci à Noëlle Béno pour m'avoir enseignée tous les codes de l'évaluation sensorielle et m'avoir formée à l'utilisation de l'olfactomètre. Merci pour ta motivation et ta bonne humeur.

Merci aux membres de la plateforme Chemosens de m'avoir permis de réaliser les analyses chromatographiques dans de bonnes conditions.

Merci à tous les membres de l'équipe avec qui j'ai partagé un café, un repas, une discussion: Fabrice, Frank, Jean-Marie, Loïc, Marie-Chantal, Martine, Michel, Nicolas, Philippe, Sébastien, les personnels animaliers : Bruno, Elise, Laurence, Raymond, et à toutes les secrétaires.

Un grand merci à ma « colocataire » de bureau, devenue amie plus que collègue, mais aussi aux anciens qui m'ont appris tous les secrets de la thèse. Je pense spécialement à Elodie, Laurence, Maud, Nicolas, Sofiane, vous m'avez montré le chemin...j'y suis arrivée !

Je dédie ce travail à mes parents, Malika et Bouchta, qui m'ont toujours encouragée à faire ce que j'aime et qui ont toujours cru en moi, à mes frères, à mes sœurs, à ma belle-famille pour leur soutien.

Il m'est bien évidemment impossible de ne pas citer l'homme qui a été la plus grande chance de ma vie : mon époux Moustapha pour avoir accepté tant de sacrifices durant ces années. Il a su me donner tout ce qu'il faut pour réussir. Merci de tout mon cœur pour ton amour et ton appui moral.

SOMMAIRE

	Page
Liste des abréviations	5
Liste des figures	7
Liste des tableaux	10
Introduction.....	13
I. La perception olfactive.....	16
I.1 Les molécules odorantes.....	17
I.2 Anatomie du système olfactif principal.....	18
I.2.1 Le mucus.....	19
I.2.2 L'épithélium olfactif.....	19
I.2.3 Le bulbe olfactif.....	23
I.2.4 Les structures centrales de l'olfaction	26
I.3 Les récepteurs olfactifs.....	28
I.3.1 Structure	28
I.3.2 Aspects génétiques.....	31
I.3.3 Classification des récepteurs olfactifs.....	33
I.3.4 Fonctionnement des récepteurs olfactifs.....	34
I.3.5 Activation des récepteurs olfactifs par les odorants	38
II. Perception des mélanges de molécules odorantes.....	45
II.1 Impact des mélanges sur les principales dimensions des odeurs.....	45
II.1.1 La qualité	45
II.1.2 L'intensité	46
II.1.3 La tonalité hédonique	48
II.2 Les différents niveaux d'intégration des signaux	49
II.2.1 Niveau pré-sensoriel.....	49
II.2.2 Niveau périphérique	50
II.2.3 Niveau du bulbe olfactif	52
II.2.4 Niveau du cortex piriforme.....	54
II.2.5 Niveau central	55

Objectif et démarche expérimentale.....	57
Chapitre I : Activation des récepteurs olfactifs par des mélanges binaires d’aldéhydes.61	
I. Introduction	62
II. Matériels et méthodes.....	65
II.1 Odorants	65
II.2 Amplification des plasmides.....	65
II.3 Culture cellulaire.....	66
II.4 Transfection	67
II.5 Imagerie calcique	68
II.6 Expression des résultats.....	69
III. Résultats	72
III.1 Activation des récepteurs olfactifs par les odorants appliqués isolément.....	72
III.2 Activation des récepteurs olfactifs par les mélanges	74
IV. Discussion	81
Chapitre II : Activation des neurones sensoriels olfactifs par des mélanges binaires d’aldéhydes	89
I. Introduction	90
II. Matériels et méthodes.....	91
II.1 Préparation des solutions d’odorants et du tampon de perfusion	91
II.2 Préparation de la muqueuse olfactive.....	92
II.3 Descriptif du poste d’enregistrement	93
II.4 Analyse des enregistrements d’EOG.....	95
II.5 Protocole expérimental.....	96
II.6 Expressions des résultats	98
III. Résultats	99
IV. Discussion	105
Chapitre III : Etude psychophysique des mélanges binaires d’aldéhydes	111
I. Introduction	112
II. Matériels et méthodes.....	114

II.1 Sujets participant à l'étude	114
II.1.1 Test I : test européen de la capacité olfactive (ETOC).....	114
II.1.2 Test II : test de Bourdon	115
II.1.3 Test III : capacité à décrire une odeur	115
II.1.4 Test IV : capacité à évaluer l'intensité odorante sur une échelle linéaire.....	116
II.1.5 Test V : capacité à classer des odeurs d'intensité croissante	117
II.1.6 Constitution du panel final.....	117
II.2 Odeurs	118
II.2.1 Olfactomètre.....	118
II.2.2 Stimuli.....	119
II.3 Procédure expérimentale	120
II.3.1 Séances d'entraînement	120
II.3.2 Séances de mesures	122
II.4 Analyses physicochimiques.....	124
II.5 Analyses statistiques des données sensorielles.....	126
II.5.1 Réponses quantitatives.....	126
II.5.2 Réponses qualitatives	127
II.5.3 Réponses hédoniques.....	128
III. Résultats	129
III.1 Analyses physicochimiques	129
III.2 Intensité odorante.....	130
III.3 Qualité odorante.....	134
III.4 La valence hédonique.....	139
IV. Discussion	144
Chapitre IV : Etude du mélange acétate d'isoamyle et whisky lactone.....	149
Discussion générale et perspectives.....	167
Références bibliographique.....	175
Annexe.....	193

Liste des abréviations

AC : Adénylate cyclase
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
ATP: Adénosine triphosphate
BO : Bulbe olfactif
But : Butanol
Cit : Citronellal
CNG: Cyclic Nucleotide-Gated Channel
CP : Cortex piriforme
CPG : Chromatographie en Phase Gazeuse
DAG: Diacyglycerol
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EMX : Enzymes du métabolisme des xénobiotiques
EO : Epithélium olfactif
EOG : Electro-olfactogrammes
ES : Erreur Type
ETOC : European Test of Olfactory Capabilities
FGF: Fibroblast Growth factor
Fura-2-AM : Fura-2-acétoxy-méthyl-ester
GABA : Acide Gamma-Aminobutyrique
GDP : Guanosine diphosphate
GFP : Green fluorescent protein
GRK: Kinases de récepteurs couplés à des protéines G
GTP : Guanosine triphosphate
HEK: Human Embryonic Kidney
HEPES : acide sulfonique n-2-hydroxyéthylpipérazine-n-2-éthane
IBMX : 3-Isobutyl-1-méthylxanthine
IP3 : Inositol triphosphate
IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle
ISO : Isoamyl acétate
MDR : Multi drug resistance proteins
MEM : Minimum Essential Medium
Méth : Méthional

MO : Muqueuse olfactive
MRP : Multi drug resistance-associated proteins
NO : Neurones olfactifs
NOA : Noyau Olfactif Antérieur
OBP : Odorant Binding Protein
Oct : Octanal
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIP2: Phosphatidylinositol diphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol triphosphate
Ppm : Partie par million
RCPG : Récepteurs couplés à des protéines G
REEP : Receptor expression enhancing protein
Ric : Resistance to inhibitors of cholinesterase
RO: Récepteurs olfactifs
RTP : Receptor transporting protein
TEP : Tomographie par émission de positions
TM : Domaines transmembranaires
WL : Whisky lactone

Liste des figures

Page

- Figure 1** : Organisation anatomique des premiers étages du système olfactif.**Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 2** : Exemple de relations structure-odeur perçue..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 3** : Histologie de l'épithélium olfactif..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 4** : Schéma illustrant les connexions entre l'épithélium olfactif et le bulbe olfactif
..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 5** : Structure schématique du bulbe olfactif principal.....24
- Figure 6** : Organisation des différents domaines du bulbe olfactif chez la souris.....**Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 7** : Représentation schématique de voies olfactives cérébrales chez l'Homme vu du côté gauche..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 8** : Organisation des voies olfactives centrales **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 9** : Représentation schématique de la structure d'un récepteur olfactif de mammifères
..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 10** : Représentation de la structure tridimensionnelle d'un complexe entre un récepteur olfactif et une molécule odorante **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 11** : Arbre phylogénétique et nombre de gènes des récepteurs olfactifs identifiés à partir des séquences du génome de divers organismes **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 12** : Diversité et effets des sous-unités de protéines G **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 13** : Voies de transduction du signal dans les neurones olfactifs**Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 14** : Exemple caractéristique d'enregistrement d'électro-olfactogramme après une stimulation par un odorant38
- Figure 15** : Codage combinatoire de l'information olfactive..... **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 16** : Représentation schématique du codage périphérique d'un mélange binaire d'odorants **Erreur ! Signet non défini.**
- Figure 17** : Les différents effets de mélanges sur la perception de l'intensité.....48
- Figure 18** : Rôle potentiel de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dans la modulation du signal olfactif chez les mammifères51

Figure 19 : Patrons d'activation glomérulaire engendrés chez la souris par le pentanoate de méthyle (0,25% vapeur saturante), le butanoate d'éthyle (0,25% vapeur saturante) et le mélange de ces 2 composés	Erreur ! Signet non défini.
Figure 20 : Principales interactions quantitatives induites par les mélanges binaires.....	71
Figure 21 : Activation des cellules Hana3A exprimant les récepteurs olfactifs humains OR1G1, OR2W1, OR52D1 ou OR1A1 par les odorants appliqués isolément.....	74
Figure 22 : Activation des cellules Hana3A exprimant le récepteur olfactif de rat rI7 par les odorants appliqués isolément.....	74
Figure 23 : Activation des cellules Hana3A exprimant les récepteurs humains OR1G1, OR2W1, OR52D1 ou OR1A1 par le mélange binaire octanal + citronellal (Oct + Cit).....	76
Figure 24 : Activation des cellules Hana3A exprimant les récepteurs humains OR1G1, OR2W1, OR52D1 ou OR1A1 par le mélange binaire octanal + méthional (Oct + Méth).	78
Figure 25 : Activation des cellules Hana3A exprimant le récepteur humain rI7 par les mélanges binaires octanal + citronellal (Oct + Cit) (graphes A et B), et octanal + méthional (Oct + Méth) (graphes C et D).....	78
Figure 26 : Vue du système olfactif périphérique de rat après une coupe sagittale.....	92
Figure 27 : Vue de la chambre d'enregistrement des signaux EOG.	94
Figure 28 : Représentation schématique du dispositif d'enregistrement d'EOG <i>ex-vivo</i>	94
Figure 29 : Exemple de trace d'EOG obtenue lors de l'application d'un stimulus odorant....	95
Figure 30 : Protocole expérimental mis en œuvre lors de chaque séance d'EOG.	97
Figure 31 : Amplitudes des signaux EOG générés par l'Octanal (Oct) et le Citronellal (Cit) et leurs mélanges.....	100
Figure 32 : Amplitude des signaux EOG générés par les différents ratios du mélange Oct + Cit au niveau de la MO, selon la représentation $[\sigma = f(\tau_{oct})]$	101
Figure 33 : Amplitudes des signaux EOG générés par l'Octanal (Oct) et le Méthional (Méth) et leurs mélange.....	103
Figure 34 : Amplitude des signaux EOG générés par les différents ratios du mélange Oct + Méth, selon la représentation $[\sigma = f(\tau_{oct})]$	104
Figure 35 : Echelle linéaire non structurée utilisée par les participants pour l'évaluation de l'intensité des huit concentrations de 1-butanol proposée dans le test des capacités à évaluer l'intensité odorante sur une échelle linéaire (phase de sélection).	116

Figure 36 : Echelle utilisée par les participants pour consigner le résultat de leur classement des huit concentrations de 1-butanol dans le test des capacités à classer des odeurs d'intensité croissante (phase de sélection).....	117
Figure 37 : Vue de l'olfactomètre et du port olfactif et de la cabine où s'installe le sujet...	119
Figure 38 : Echelle linéaire structurée correspondant à l'échelle perceptive de 1-butanol...	121
Figure 39 : Echelle linéaire non structurée utilisée par les participants pour évaluer le caractère hédonique des stimuli lors des séances de mesure.	122
Figure 40 : Exemple de questionnaire pour l'évaluation de la qualité des stimuli lors des séances de mesure.	123
Figure 41 : Piège Tenax (à gauche) et sac Téflon (à droite) utilisés pour l'analyse des stimuli contenant du Méth délivrés par l'olfactomètre.	124
Figure 42 : Principe du prélèvement sur piège Tenax	125
Figure 43 : Intensité perçue pour les odeurs d'Octanal (Oct), de Citronellal et de leurs mélanges.	130
Figure 44 : Intensité perçue pour les mélanges Oct + Cit selon la représentation $\sigma = f(\tau)$. $\sigma = I_{(Oct+Cit)} / (I_{Oct} + I_{Cit})$ et $\tau_{Oct} = I_{Oct} / (I_{Oct} + I_{Cit})$	131
Figure 45 : Intensité perçue pour les odeurs d'Octanal (Oct) et de Méthional (Méth) et de leurs mélanges.	132
Figure 46 : Intensité perçue pour les mélanges Oct + Méth selon la représentation $\sigma = f(\tau)$. $\sigma = I_{(Oct+Méth)} / (I_{Oct} + I_{Méth})$ et $\tau_{Oct} = I_{Oct} / (I_{Oct} + I_{Méth})$	133
Figure 47 : Proportion d'identification des odeurs liées à l'Octanal (Oct) et au Citronellal pour chaque stimulus (odorants seuls et leurs mélanges).....	134
Figure 48 : Proportion d'identification exprimée en fonction de $\tau_{Octanal}$ pour le mélange Octanal + Citronellal.	135
Figure 49 : Proportion d'identification des odeurs liées à l'Octanal (Oct), au Méthional (Méth) pour chaque stimulus (odorants seuls et leurs mélanges).....	137
Figure 50 : Proportion d'identification exprimée en fonction de $\tau_{(Octanal)}$ pour le mélange Octanal + Méthional.	138
Figure 51 : (A) Appréciation hédonique moyenne (\pm ES ; n=19) pour les différentes concentrations d'Octanal (Oct), de Citronellal et de leurs mélanges. (B) Corrélation ente appréciation hédonique moyenne et intensité odorante moyenne pour chacun des 25 stimuli du mélange Oct + Cit.....	140

Figure 52: Evolution de l'appréciation hédonique des mélanges Oct + Cit en fonction de la proportion perceptive des odorants dans les mélanges (τ_{Octanal}).....141

Figure 53: (A) Appréciation hédonique moyenne (\pm ES ; n=19) pour les différentes concentrations d'Octanal (Oct), de Methional (Meth) et de leurs mélanges. (B) Corrélation entre l'appréciation hédonique moyenne et l'intensité odorante moyenne pour chacun des 25 stimuli du mélange Oct + Meth.....142

Figure 54: Evolution de l'appréciation hédonique des mélanges Oct + Méth en fonction de la proportion perceptive des odorants dans les mélanges (τ_{Octanal}).....143

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1 : Caractéristiques des molécules odorantes étudiées.....	65
Tableau 2 : Antibiotiques de sélection utilisés pour la croissance des bactéries transformées.	66
Tableau 3 : Composition du tampon de perfusion.	91
Tableau 4: Présentation des mélanges d'odorants étudiés et correspondance entre concentrations et codes utilisés pour la représentation des résultats.....	97
Tableau 5 : Moyennes et Erreurs type (ES) des intensités des 6 niveaux de l'échelle 1-butanol.	120
Tableau 6 : Concentrations des stimuli, Butanol (But), Octanal (Oct), Citronellal et Méthional (Méth), à la sortie de l'olfactomètre.	129

Introduction

Toutes les espèces animales possèdent des capacités sensorielles qui leur permettent d'interagir avec l'environnement immédiat. Au cours de l'évolution, les vertébrés aériens ont développé plusieurs systèmes pour répondre à la variété des signaux présents dans leur biotope. Parmi ceux-ci, l'odorat permet de percevoir des produits chimiques volatils véhiculés par l'air. Ce sens permet aux animaux de caractériser le milieu pour assurer des fonctions vitales, telles que la recherche de nourriture, la détection de prédateurs ou d'autres dangers. Chez certaines espèces, l'odorat permet aussi la communication entre individus, à des distances pouvant atteindre plusieurs kilomètres. Cette communication peut avoir plusieurs fonctions comme rassembler le groupe, déclencher des réactions d'attaque et de défense ou des activités liées à la reproduction et l'allaitement. Bien que l'on considère que l'odorat ait, chez l'Homme, un rôle moins important que la vue et l'audition, ce sens contribue significativement à la perception du milieu extérieur. L'olfaction intervient en particulier dans le comportement alimentaire, en permettant par exemple de détecter si un aliment est impropre à la consommation, ou dans les réactions émotionnelles liées à l'acte alimentaire. Le sens de l'olfaction joue donc un rôle majeur dans l'identification et l'acceptabilité des aliments. Les conséquences des désordres olfactifs observés dans certaines pathologies témoignent de l'importance de ce sens dans le comportement alimentaire.

En dépit de son ancienneté phylogénétique, le système olfactif obéit aux principes de base qui régissent les autres modalités sensorielles : à la périphérie, les stimuli chimiques sont détectés par des récepteurs olfactifs, puis sont codés sous forme de signaux électriques qui sont transmis aux centres supérieurs. L'olfaction connaît depuis quelques années un regain d'intérêt. De multiples investigations scientifiques ont fourni de nouvelles données sur la structure et la fonction des récepteurs présents dans la cavité nasale. Les connaissances génétiques sur les récepteurs ont notamment dévoilé une réduction considérable du nombre de gènes olfactifs fonctionnels dans l'espèce humaine, alimentant ainsi une réflexion sur l'évolution de l'odorat. Ces récepteurs appelés récepteurs olfactifs (RO) appartiennent à la super famille des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG) ; ils sont capables de détecter des milliers de molécules odorantes. La majorité des récepteurs de mammifères sont encore orphelins aujourd'hui, c'est-à-dire que l'on ne connaît pas leurs ligands. Cependant un certain nombre d'études ont montré que le spectre des molécules odorantes reconnu par les RO peut être assez large (Saito et al., 2009; Sanz et al., 2005) ou au contraire très restreint (Keller et al., 2007; Saito et al., 2009). Le récepteur de rat r17 et le récepteur humain OR17-40 ont été

les premiers RO de mammifère à être clonés ; l'octanal et l'hélional ont été respectivement identifiés comme des ligands spécifiques de ces récepteurs (Wetzel et al., 1999; Zhao et al., 1998).

Dans la majorité des cas, les odeurs résultent de la perception d'un mélange de plusieurs molécules odorantes. Cette complexité soulève d'intéressantes questions sur les caractéristiques du système olfactif qui permettent aux diverses espèces de percevoir et reconnaître un nombre a priori illimité d'odeurs sur la base de combinaison de molécules odorantes. Ces combinaisons induisent des interactions perceptives qui démultiplient en effet les possibilités de codage de l'information. Par exemple, dans un mélange, l'odeur d'un composant peut masquer celle d'un autre composant, qui au final ne sera donc pas perçu. Une autre interaction possible est la fusion perceptive ; dans ce cas, les constituants du mélange ne sont plus perçus en tant qu'entités uniques, mais fusionnent pour donner lieu à la perception d'une autre odeur plus ou moins différente de celles portées par les composants du mélange; dans ce cas on parle de perception synthétique du mélange. L'origine de ces interactions perceptives est encore largement méconnue et plusieurs niveaux d'interaction (périphérique, bulbaire et/ou central) sont proposés.

Dans cette thèse, nous nous sommes attachés à mieux comprendre comment s'effectue l'encodage de l'information portée par des mélanges d'odorants. Nous avons centré nos travaux sur l'étude de mélanges binaires au niveau périphérique du système olfactif et au niveau perceptif intégré.

La section introductive de ce manuscrit est organisée en deux parties distinctes. Le premier chapitre s'intéresse plus particulièrement à l'organisation anatomique et fonctionnelle du système olfactif principal chez les mammifères ainsi qu'au trajet emprunté par le message olfactif, de la périphérie jusqu'aux différentes structures cérébrales impliquées dans le traitement de l'information olfactive. Le second chapitre est consacré à la présentation des caractéristiques perceptives des mélanges de molécules odorantes et des principaux niveaux d'intégration des signaux induits par les mélanges.

I. La perception olfactive

Chez la plupart des mammifères, le système olfactif comprend deux sous-systèmes: le système olfactif principal et le système olfactif accessoire. Le système olfactif principal est composé en périphérie de l'épithélium olfactif principal et du bulbe olfactif principal, premier centre intégrateur de ce sous-système. Le système olfactif accessoire périphérique comprend l'organe voméronasal, l'organe septal ou organe de Masera et le ganglion de Grueneberg. L'organe voméronasal est situé à la base de la cloison septale ; au niveau central. Le bulbe olfactif accessoire est localisé en position dorsale et caudale du bulbe olfactif principal (Figure 1). Il a été classiquement décrit que le système olfactif principal permet de percevoir exclusivement les odeurs générales de l'environnement alors que le système olfactif accessoire permet de détecter spécifiquement les phéromones (Firestein, 2001; Meisami and Bhatnagar, 1998). Ainsi, le système olfactif principal se projette sur de nombreuses structures corticales et sous-corticales, alors que le système olfactif accessoire se projette de manière restreinte et privilégiée sur les aires cérébrales responsables des comportements sociaux et reproductifs. Toutefois, cette dichotomie entre le système olfactif principal et accessoire semble être aujourd'hui remise en cause car plusieurs études ont démontré que les deux systèmes sont sensibles à des signaux généraux et phéromonaux, et qu'ils se projettent sur des aires corticales distinctes mais également communes (Ferrero and Liberles, 2010; Martinez-Marcos, 2009 ; Zufall and Leinders-Zufall, 2007).

Pour atteindre le système olfactif, les odorants peuvent emprunter deux voies différentes: la voie orthonasale, lorsque l'air inspiré arrive directement dans la cavité nasale via le nez, et la voie rétronasale, lorsque les molécules odorantes constitutives des aliments, les arômes, sont libérées dans la bouche lors de la mastication. Dans ce dernier cas, les molécules remontent vers les cavités nasales par l'arrière du voile du palais.

La réponse sensorielle à un stimulus olfactif résulte de la transformation d'un signal d'origine chimique porté par « les molécules odorantes » en une perception consciente, « l'odeur ». Les propriétés physicochimiques des stimuli sensoriels ainsi que les bases anatomiques et physiologiques du système olfactif principal impliquées dans la genèse d'une odeur sont présentées ci-après.

I.1 Les molécules odorantes

Afin d'être perçues et traitées par le système olfactif, les molécules odorantes sont volatiles. Ce sont en général des petites molécules organiques possédant un poids moléculaire inférieur à 300 Da. Plus la pression de vapeur saturante (concentration maximale en phase gazeuse à une pression et une température données) est forte, plus le nombre de molécules susceptibles d'atteindre la muqueuse olfactive est important. Elles doivent également être à la fois hydrosolubles pour se dissoudre dans le mucus et parvenir jusqu'aux RO et liposolubles pour interagir avec les récepteurs localisés dans la membrane plasmique des neurones olfactifs. Les molécules odorantes sont diversement fonctionnalisées : esters, alcools, cétones, aldéhydes, amines, etc..., certaines portant plusieurs groupes fonctionnels (Thomas-Danguin et al., 2012).

Compte tenu du nombre considérable de molécules odorantes, plusieurs équipes ont tenté de les classer en fonction de leur odeur. Dans les années 1960, John Amoore a proposé sept catégories d'odeurs primaires en se basant sur la qualité perceptive et la structure des molécules odorantes : piquant, floral, musqué, camphré, mentholé, éthéré et putride. Ainsi les molécules ayant une odeur camphrée auraient une forme sphérique, et celles ayant une odeur musquée auraient une forme de disque (Amoore et al., 1964). Mais cette classification structurale des molécules odorantes est imparfaite car la perception des odeurs peut changer selon la concentration. Par exemple, l'indole présente une odeur florale à faible concentration,

et une odeur fécale à forte concentration. Par ailleurs, des molécules présentant des structures proches (comme les énantiomères) peuvent porter des odeurs voisines ou au contraire, des odeurs différentes (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) (Güven and Laska, 2012; Laing et al., 2003). A l'inverse, des molécules de structures différentes telles que l' α -androsténole et le brassylate d'éthyle peuvent générer des odeurs proches, comme la note « musc » dans le cas de ces 2 molécules. Malgré ces limitations, la classification d'Amoore montre que le système olfactif est capable d'identifier des substances odorantes très variées en termes de taille, structure et groupements fonctionnels.

I.2 Anatomie du système olfactif principal

Le système olfactif est organisé de manière similaire chez les vertébrés et de nombreux invertébrés. On distingue deux niveaux d'organisation dans le fonctionnement du système olfactif. Le premier se situe à la périphérie du système olfactif ; il concerne l'arrivée de la molécule odorante au voisinage du mucus et des récepteurs moléculaires, puis la genèse du signal par les neurones olfactifs. Le second niveau implique le bulbe olfactif et les centres supérieurs qui participent au traitement du signal conduisant à la perception et à la reconnaissance des odeurs.

Dans ce chapitre, nous décrirons l'anatomie des systèmes périphériques et centraux de mammifères impliqués dans le traitement des stimuli olfactifs, depuis les récepteurs jusqu'aux aires cérébrales de hauts niveaux. Nous effectuerons également quelques comparaisons avec le système olfactif des insectes.

I.2.1 Le mucus

Situé entre la lumière nasale et l'épithélium olfactif, le mucus est le lieu où se déroulent les événements péri-récepteurs de la réception olfactive. Le mucus est un mélange hétérogène constitué de deux phases qui recouvre toute la surface de la muqueuse (2 cm² chez l'Homme). L'une est liquide et composée principalement d'eau, l'autre est visqueuse. Plusieurs glandes dont les glandes de Bowman contribuent à la sécrétion du mucus. Le mucus olfactif semble remplir plusieurs fonctions. Il jouerait un rôle de défense immunitaire et de biotransformation du fait de la présence d'immunoglobulines et de protéines impliquées dans le métabolisme des molécules exogènes comme les carboxylestérases (Debat et al., 2007) ; (Nagashima and Touhara, 2010). De plus, la découverte dans le mucus de protéines liant les molécules odorantes a conduit à élaborer l'hypothèse selon laquelle ces protéines, appelées *Odorant Binding Protein* (OBP), prendraient en charge les molécules odorantes pour les véhiculer vers les RO (Briand et al., 2002). Les caractéristiques de ces protéines sont développées plus loin.

I.2.2 L'épithélium olfactif

Le signal olfactif est initié lorsque les molécules odorantes entrent en contact avec l'épithélium olfactif (EO), situé sur la partie supérieure des fosses nasales. L'EO repose sur une *lamina propria*, et il est composé de trois types de cellules (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**): les neurones olfactifs, les cellules basales et les cellules de soutien (Schwob, 2002).

Les neurones sensoriels olfactifs (NSO) sont des neurones bipolaires responsables de la transduction de l'information olfactive. Les NSO des mammifères et des insectes présentent des similitudes morphologiques. Ils sont formés d'un axone se projetant vers le bulbe olfactif (mammifères) ou le lobe antennaire (insectes) selon une organisation topographique relativement bien conservée chez tous les vertébrés et invertébrés, et d'une dendrite pourvue de nombreux cils olfactifs baignant dans le mucus. Les récepteurs des molécules odorantes, appelés récepteurs olfactifs (RO), sont localisés au niveau des membranes des cils. Chez les mammifères, chaque neurone exprime un seul type de RO (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) (Chess et al., 1994 ; Malnic et al., 1999 ; Menco et al., 1997 ; Serizawa et al., 2000). Chez les hexapodes comme la drosophile, les NSO sont localisés dans les palpes maxillaires et les antennes. Chaque cil comporte deux ou trois types de récepteurs, l'un spécifique d'une molécule odorante et l'autre, ubiquitaire, présent dans tous les NSO et potentiellement un troisième type de récepteur (Bargmann, 2006). La structure et le fonctionnement des RO sont présentés dans la partie suivante (I.3)

Les NSO sont les seuls neurones de l'organisme en contact direct avec l'environnement. De par leur emplacement, ils sont exposés non seulement aux molécules odorantes mais également à des molécules volatiles potentiellement nocives ainsi qu'aux agents pathogènes en suspension dans l'air (Schwob, 2002). Probablement pour faire face à ces agressions, les neurones sensoriels, contrairement à la majorité des cellules neuronales, ont la capacité de se régénérer, même à l'âge adulte, à partir des cellules basales. Les NSO suivent un cycle de croissance, mort et régénération, dont la durée de vie varie entre 30 et 120 jours. Ainsi au sein de l'épithélium cohabitent des NSO matures et immatures (Crews and Hunter, 1994; Graziadei and Graziadei, 1979).

Les cellules de soutien sont des cellules polarisées s'étendant de la lame basale jusqu'à la lumière nasale où elles forment des microvillosités. Elles participent au maintien de l'intégrité morphologique et fonctionnelle de l'EO. En effet, les cellules de soutien assurent la cohésion cellulaire de l'épithélium grâce à la présence de jonctions serrées à leur pôle apical (Steinke et al., 2008). De plus, par leurs activités enzymatiques et phagocytaires, les cellules de soutien assurent la protection de l'épithélium (Schwob, 2002). Chez les insectes, les cellules correspondantes, appelées cellules accessoires, sont typiquement au nombre de trois par sensille : la cellule la plus interne (thécogène), la cellule intermédiaire (trichogène) et la cellule externe (tormogène). Les membranes apicales des cellules trichogènes et tormogènes, en contact avec la lymphe sensillaire, sont plissées et renouvellent en permanence la lymphe sensillaire.

Les cellules basales sont de deux natures : *les cellules horizontales*, les plus profondes, en contact direct avec la lame basale, et *les cellules globulaires*, qui se positionnent juste au-dessus des cellules horizontales. Les cellules globulaires présentent un fort taux de prolifération et fournissent des populations de cellules souches qui permettent le renouvellement des NSO (Beites et al., 2005; Schwob, 2002). Plusieurs facteurs stimulent et régulent la prolifération et la survie des cellules souches. Les principaux facteurs de régulation sont des facteurs de signalisation comme la famille des facteurs de croissance fibroblastique FGF (Fibroblast Growth factor) qui semblent promouvoir la différenciation neuronale, des protéines de la morphogenèse osseuse ainsi que le facteur de croissance et de différenciation 11 (Calof et al., 2002). Ce renouvellement a été constaté chez des espèces

aussi diverses que les mollusques et des crustacés (Steullet et al., 2000). En revanche, un tel renouvellement n'a pas été mis en évidence chez les insectes.

I.2.3 Le bulbe olfactif

Le bulbe olfactif (BO) constitue le premier relais central de l'information olfactive en provenance des NSO. C'est une structure paire de forme ovale. Chez les mammifères, notamment chez les rongeurs, le BO forme l'extrémité la plus rostrale du système nerveux central. Il présente une structure laminaire concentrique au sein de laquelle s'individualisent six couches de cellules et de fibres qui participent à la réception, au traitement et au relai des messages olfactifs (Figure 5).

De l'extérieur vers l'intérieur du BO, on distingue :

- la *couche des nerfs olfactifs*, qui ne comporte pas de corps cellulaires, et qui est constituée des faisceaux d'axones non myélinisés des neurones de l'EO (Whitman and Greer, 2009).
- la *couche glomérulaire*, qui est constituée de structures sphériques d'environ 100 µm de diamètre: les glomérules. Ce sont des centres de contacts synaptiques entre les axones des neurones de l'EO et les dendrites de plusieurs neurones, dont des cellules mitrales. Chez la souris, chaque glomérule reçoit des axones d'environ 25 000 neurones olfactifs qui font synapse avec les dendrites apicales d'environ 25 cellules mitrales. Cette convergence a pour conséquence l'augmentation de la puissance du signal (Duchamp-Viret et al., 1989).
- la *couche plexiforme* externe composée essentiellement de fibres et de contacts synaptiques. C'est dans cette couche que se situent les corps cellulaires des cellules à panache, un type de neurones relais (Shepherd, 1972).
- la *couche mitrale* formée par les corps cellulaires des cellules mitrales qui sont les principaux neurones du BO. Chez les mammifères, les cellules mitrales ne connectent qu'un glomérule (Buonviso and Chaput, 1990), alors que chez l'insecte, les neurones de projections peuvent connecter plusieurs glomérules (Kirschner et al., 2006). Ces neurones sont à la fois à l'entrée du système bulbaire, puisque la dendrite principale reçoit les informations en provenance des neurones

récepteurs de l'épithélium, et à la sortie de celui-ci, puisque son axone quitte le bulbe et se projette sur différents territoires du télencéphale (cette disposition justifie qu'on les qualifie de neurones relais).

- la *couche pléxiforme* interne, très fine, qui n'est constituée que de prolongements neuronaux. Elle est traversée par les axones et les collatérales d'axones des cellules relais, par les axones et les ramifications axonales de fibres centrifuges, ainsi que par les dendrites des cellules granulaires.
- la *couche granulaire*, la couche la plus profonde du BO, qui contient des petites cellules dépourvues d'axones. Les cellules granulaires contiennent des gemmules et des épines sur lesquelles s'effectuent de nombreux contacts synaptiques avec les dendrites des neurones relais et les terminaisons axonales de fibres en provenance des régions cérébrales. La couche granulaire est traversée par les axones des cellules relais qui se regroupent au cœur du BO pour former le tractus olfactif latéral, principale voie de sortie de cette structure.

Les différents types cellulaires du BO semblent s'organiser en colonnes fonctionnelles. En effet, chaque glomérule reçoit les terminaisons axonales de NSO exprimant le même récepteur. Les cellules mitrales connectées à un même glomérule ainsi que les interneurons sont regroupés spatialement (Buonviso and Chaput, 1990 ; Willhite et al., 2006). Des études récentes ont montré qu'il existe une organisation fonctionnelle du BO en trois domaines (DI, DII et V), notamment chez la souris. Ces domaines sont associés à des comportements spécifiques, chacun répondant à des molécules induisant les mêmes types de comportement (Matsumoto et al., 2010). Le domaine DI est impliqué dans l'expression de comportements aversifs envers des odeurs putrides, le domaine DII dans des comportements de peur, provoquée notamment par la TMT (2, 4, 5-trimethylthiazoline), et dans des réponses agressives envers d'autres mâles, et le domaine V dans des réponses aux odeurs de nourriture (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) (Mori and Sakano, 2011).

I.2.4 Les structures centrales de l'olfaction

A la sortie du BO, les cellules mitrales et les cellules à panache forment un faisceau d'axones appelé tractus olfactif latéral qui se projette sur plusieurs structures du système nerveux central. Ces structures, regroupées sous le nom de cortex olfactif primaire, sont constituées par le cortex piriforme, le tubercule olfactif, le cortex entorhinal, le cortex périamygdalien et le noyau olfactif antérieur (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ces aires corticales primaires sont interconnectées par un réseau de connections associatives, ce qui permet de transmettre l'information olfactive à des structures sous corticales et corticales, tels que l'hippocampe, l'hypothalamus, le thalamus et le cortex orbito-frontal. Chez les invertébrés, les neurones de projections envoient leurs axones dans le corps pédonculé et le protocérébron latéral qui correspondent aux zones de traitement de haut niveau chez les mammifères.

Il existe deux voies de transmission olfactive. Une première voie nerveuse se dirige directement ou via un relais au niveau du thalamus, vers le cortex orbito-frontal. Cette projection dans le néocortex est impliquée dans la discrimination des odeurs (Savic et al., 2000). Une deuxième voie nerveuse projette dans le système limbique (Savic, 2001). Elle se divise pour rejoindre d'une part le cortex entorhinal et l'hippocampe où elle intervient dans les processus mnésiques, et d'autre part l'hypothalamus et le tegmentum du mésencéphale impliqués dans les processus émotionnels (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**).

I.3 Les récepteurs olfactifs

La première étape de la détection olfactive implique des interactions biochimiques entre les molécules odorantes et les récepteurs olfactifs (RO) localisés dans la membrane plasmique des neurones olfactifs. Linda Buck et Richard Axel ont été les premiers à démontrer que les RO appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG) (Buck and Axel, 1991). Les gènes des RO sont classés dans la famille des RCPG rhodopsin-like qui inclut la rhodopsine et d'autres récepteurs impliqués dans la détection de neurotransmetteurs, d'hormones peptidiques, de chimiokines, de lipides, de nucléotides, etc... (Fredriksson et al., 2003). Chez les rongeurs, on dénombre plus d'un millier de gènes codant des RO tandis que le nombre de gènes codant des RO humains s'élève à environ 400 (Niimura, 2012). Ils constituent ainsi la plus grande famille multigénique chez les mammifères (environ 2 à 4 % du génome). La découverte de Buck et Axel a ouvert la porte à de nombreuses études moléculaires. Les gènes codant les récepteurs olfactifs de divers organismes ont été identifiés (Nei et al., 2008; Niimura and Nei, 2006). Le récepteur OR17-40 est le premier récepteur humain à avoir été cloné, exprimé et caractérisé fonctionnellement, le ligand le plus efficace étant l'héliional (Hatt et al., 1999; Wetzel et al., 1999).

I.3.1 Structure

Les RO sont des récepteurs qui s'associent à une protéine G pour permettre la transduction du signal après activation extracellulaire par un ligand. Ils sont dotés de sept domaines transmembranaires (TM1 à TM7) réunis en faisceau et reliés par trois boucles externes et trois boucles cytoplasmiques, et comportant un domaine extracellulaire (N-terminal) et un domaine intracellulaire (C-terminal ; **Erreur! Source du renvoi introuvable.**). Les RO sont des protéines de petite taille (300 à 350 acides aminés) qui se distinguent par une très grande seconde boucle extracellulaire, une troisième boucle courte et des séquences d'acides aminés conservées (Zhao and Firestein, 1999). Ainsi, dans la zone «MAYDRYVAIC» située à la jonction du domaine TM3 et de la boucle intracellulaire entre TM3 et TM4, la séquence de trois acides aminés «DRY» (acide aspartique-arginine-tyrosine) est hautement conservée parmi les RCPG rhodopsin-like (**Erreur! Source du renvoi introuvable.**). Bien que les mécanismes d'activation des RCPG ne soient pas totalement établis, la séquence DRY jouerait un rôle important dans le couplage avec la

protéine G (Rovati et al., 2007). La comparaison des séquences de multiples RO de mammifères a par ailleurs mis en évidence une faible conservation des domaines TM3 à TM6, ce qui suggère que ces régions seraient impliquées dans la poche de liaison du ligand. En faisant l'hypothèse que la position des acides aminés impliqués dans la reconnaissance des odorants est conservée entre orthologues, c'est-à-dire homologues entre espèces, Man et collaborateurs (2004) ont identifié 22 sites potentiels de liaison chez des RO d'Homme et de souris, la majorité étant située dans les TM3 à TM7 (Man et al., 2004). Cependant cette hypothèse n'est pas toujours valable. Zhuang et collaborateurs ont ainsi montré, chez les primates, des variations de sensibilité et de spécificité entre RO orthologues (Zhuang et al., 2009).

La cristallisation du récepteur de la rhodopsine bovine et du récepteur β adrénergique a permis de modéliser un certain nombre de RO et de définir certains sites de liaison des odorants (Figure 10) (Abaffy et al., 2007 ; Palczewski et al., 2000 ; Schmiedeberg et al., 2007). Ainsi, le site de liaison de l'eugénol sur le récepteur de souris mOR-EG a été finement caractérisé (Katada et al., 2005). Une trentaine de mutations ponctuelles ont permis de démontrer que les résidus impliqués dans la reconnaissance des odorants sont hydrophobes et que le site d'interaction se situe dans une cavité située entre les domaines transmembranaires III, V et VI. Récemment, une autre étude a montré que la liaison des odorants sur le récepteur humain OR1G1 est dominée par des liaisons hydrophobes qui favorisent de multiples interactions (Charlier et al., 2012). Cette propriété expliquerait l'activation de ce récepteur par un grand nombre de molécules odorantes présentant des structures très variées. Toutefois, les agonistes d'OR1G1 se lieraient différemment en fonction de leurs groupements fonctionnels (Launay et al., 2012).

L'oligomérisation des RCPG semble jouer un rôle important dans le trafic des récepteurs à la surface cellulaire ainsi que dans la signalisation intracellulaire. Les récepteurs GABA_B constituent un exemple de RCPG qui fonctionne sous forme d'hétérodimère. Dans ce cas, GABA_{B1} fixe l'agoniste et GABA_{B2} active la protéine G (Kaupmann et al., 1998). En ce qui concerne les RO, comme il a été établi qu'un neurone de mammifère n'exprime qu'un seul et unique type de récepteur, il ne pourrait donc s'agir que d'homo-oligomérisation contrairement aux RO d'insectes qui fonctionnent sous forme d'hétérodimères. Une étude récente a ainsi mis en évidence une homo-dimérisation du RO humain OR17-40 lorsque ce récepteur est produit dans un système d'expression hétérologue (Wade et al., 2011). Par ailleurs, il a été montré que la co-expression d'un RO avec le récepteur muscarinique de type 3 augmente l'efficacité de réponse du RO (Li and Matsunami, 2011). L'association avec un autre RCPG pourrait favoriser l'adressage du RO au niveau de la membrane plasmique (Hague et al., 2004). Les relations entre l'état d'oligomérisation des récepteurs et leur capacité d'activation sont encore méconnues pour la plupart des RCPG, y compris les RO, et mériteraient d'être approfondies.

I.3.2 Aspects génétiques

Les RO sont très anciens d'un point de vue évolutif. Ils sont exprimés chez de nombreux organismes comme les insectes, les nématodes, les poissons et les mammifères. Les gènes des RO sont localisés sur tous les chromosomes, sauf le chromosomes 20 et Y (Malnic et al., 2004), ce qui indique que leur origine est liée à la duplication d'un gène ancestral commun. Cependant, la répartition des gènes sur les chromosomes n'est pas uniforme : le chromosome 11 contient ~40% d'entre eux (Niimura and Nei, 2003).

Le nombre total de gènes codant les RO est très variable selon les espèces. Il va d'une centaine chez les poissons jusqu'à plus de 2000 chez le bœuf (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) (Niimura, 2012). Cependant, une part plus ou moins importante de ces gènes a subi des mutations invalidantes. Ainsi, chez l'Homme, plus de 50% des gènes sont des pseudogènes et le nombre de gènes potentiellement fonctionnels est de 396 ; chez le rat, le pourcentage de pseudogènes est plus faible (28,7%) et le nombre des gènes actifs s'élève à ~1200. Chez la drosophile, le nombre de RO est plus limité (~ 60) et le nombre de pseudogènes est nettement inférieur à celui observé chez au sein des génomes mammaliens

(6%). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer ces variations inter-espèces. Il semble notamment que l'importance des fonctions olfactives soient spécifiques à chaque espèce. Etant donné que les RO sont impliqués dans la détection chimique du monde extérieur, il a été envisagé que cette grande famille multigénique a subi des pressions de sélection en fonction de l'environnement. L'évolution du répertoire des RO aurait ainsi conduit à l'apparition des pseudogènes.

Le polymorphisme génétique peut aussi expliquer les différences de perception olfactive entre individus d'une même espèce. Ce polymorphisme a été observé chez l'Homme et il a été démontré qu'il peut avoir des répercussions sur l'intensité et le caractère hédonique d'une odeur. Ainsi, l'androsténone (un dérivé de la testostérone) est perçue de manière variable: selon les individus, ce composé peut avoir une odeur désagréable (sueur, urine) ou agréable (odeur « sucrée » ou « florale »), ou être inodore même à forte concentration. Cette différence de perception de l'androsténone serait due à une variation génétique du récepteur OR7D4 (Keller et al., 2007). D'autres études affirment que chez l'Homme, les gènes des RO sont sous sélection positive (Gilad et al., 2003). L'équipe de Moreno-Estrada a par exemple montré par analyse génétique de 39 populations que le gène du récepteur humain OR511 est sous sélection positive (Moreno-Estrada et al., 2008). Cependant, la sélection positive des gènes des RO est controversée. Ainsi (Gimelbrant et al., 2004) n'a trouvé aucune preuve de sélection positive. La contribution de la sélection positive dans l'évolution du répertoire des gènes des RO humains serait donc mineure.

I.3.3 Classification des récepteurs olfactifs

La comparaison des séquences des RO sur certains critères d'homologie tels que la similarité de séquence d'acides aminés et la distribution phylogénétique a permis de classer les RO des vertébrés en deux grands groupes, les récepteurs de classe I et de classe II. Les récepteurs de classe I correspondent aux récepteurs ayant une forte homologie avec les récepteurs olfactifs de poisson alors que ceux de classe II sont apparus avec la vie aérienne. L'identification chez le xénope de gènes de classe I dans le diverticule latéral (terrestre) et de gènes de classe II dans le diverticule médian a renforcé cette hypothèse (Freitag et al., 1998). Une analyse de séquence a montré qu'il existe un nombre relativement important de RO de classe I dans le génome humain (Glusman et al., 2001 ; Malnic et al., 2004; Zozulya et al., 2001), de souris (Godfrey et al., 2004 ; Young et al., 2002 ; Zhang and Firestein, 2002) et d'autres espèces de mammifères (Niimura, 2007). Cela suggère que les RO de classe I peuvent également jouer un rôle important dans l'olfaction chez les mammifères, peut-être à des stades anténataux. Par ailleurs, il a été montré que les ligands des RO de classe I sont plus hydrophiles que ceux de la classe II (Saito et al., 2009).

Les RO sont organisés en familles et sous-familles, dont les membres possèdent respectivement plus de 40% et de 60% d'identité en séquence protéique (Glusman et al., 2000 ; Malnic et al., 2004). Par exemple, les récepteurs OR1A1 et OR1A2, qui ont en commun 50% d'acides aminés, répondent tous les deux au citronellal (Schmiedeberg et al., 2007). Il a également été montré que l'orthologue d'OR1A1 chez la souris (Olfr43) répond aussi au citronellal (Shirokova et al., 2005).

I.3.4 Fonctionnement des récepteurs olfactifs

a) Transduction du signal

L'activité des RCPG est modulée par trois familles de protéines: les protéines G hétérotrimériques, les kinases de RCPG (GRK) et les arrestines (Pierce et al., 2002). Les protéines G contribuent à l'activation d'enzymes participant à la production de second messenger. Elles sont constituées d'une sous-unité α et d'un dimère $\beta\gamma$. La fixation d'un ligand induirait un changement de conformation du récepteur, ce qui permettrait l'interaction avec la protéine G et induirait la dissociation de la sous-unité α et du dimère $\beta\gamma$, ainsi que l'hydrolyse du guanosine triphosphate (GTP) en guanosine diphosphate (GDP). En fonction du type de sous-unité, une voie de signalisation intra cellulaire spécifique est activée. Quatre familles de sous-unités $G\alpha$ ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ et $G\alpha_{12/13}$) ont été identifiées (Figure 12) (Bockaert and Pin, 1998; Simon et al., 1991). Les sous-unités $G\alpha_s$ stimulent l'adénylate cyclase (AC) qui conduit à la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) tandis que les $G\alpha_i$ inhibent cette voie; les sous-unités $G\alpha_q$ activent la phospholipase C et favorisent la production d'inositol triphosphate (IP3) tandis que les $G\alpha_{12/13}$ inhibent cette voie. Les GRK, quant à elles, phosphorylent la région intracellulaire du récepteur activé. Les arrestines se lient ensuite au récepteur phosphorylé et le rendent incapable d'activer l'échange GDP-GTP, provoquant la désensibilisation du récepteur.

Dans les NSO, il a été démontré qu'une sous-unité particulière, $G_{\alpha olf}$, est plus particulièrement impliquée dans la transduction du signal olfactif (Mombaerts, 1999). La liaison d'une molécule odorante avec un RO active la protéine $G_{\alpha olf}$ qui va initier la production d' AMP_C à partir d'adénosine triphosphate (ATP) via l'activation de l'AC de type III (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). L' AMP_C provoque l'ouverture de canaux ioniques CNG (cyclic nucleotide gated) présents dans la membrane plasmique du NSO, ce qui permet l'entrée de calcium (Ca^{2+}) et de sodium (Na^+). Conjointement, des ions chlorures (Cl^-) sortent de la cellule. La dépolarisation ainsi induite entraîne la production de potentiels d'action.

Même s'il ne fait aucun doute que la voie de l' AMP_C est la voie prédominante dans la genèse du signal olfactif chez les mammifères, la coexistence d'une deuxième voie de signalisation est encore évoquée à ce jour. Cette voie, qui implique l' IP_3 comme second

messager, a été mise en évidence chez les vertébrés inférieurs (Huque and Bruch, 1986), les insectes (Gomez-Diaz et al., 2006) et chez les mammifères (Breer et al., 1990). Il a été montré que l'application de citralva et d'eugenol sur des NSO de langouste (*Panulirus argus*) induit une augmentation de la concentration d'AMPc tandis que d'autres molécules odorantes telles que le lilial, le lyral et l'éthyle vanilline induisent une augmentation d'IP3 (Fadool and Ache, 1992). La liaison odorant-récepteur activerait la phospholipase C, entraînant le clivage du phosphatidylinositol diphosphate (PIP2) en diacylglycerol (DAG) et inositol triphosphate (IP3). Tout comme l'AMPc, le second messager IP3 déclencherait des conductances ioniques. Les données sont diverses selon les espèces. Une entrée aspécifique de cations et notamment de calcium a été détectée chez le homard (Fadool and Ache, 1992) et le poisson (Restrepo et al., 1990) tandis qu'un courant hyperpolarisant potassique calcium dépendant a été mis en évidence chez le triton (Morales et al., 1995). Chez les mammifères, la nature de ces canaux est moins documentée. Chez le rat l'existence d'un canal potassique dont l'activité est IP3-dépendante a été mise en évidence (Okada et al., 1994). Toutefois, la cible ou les cibles de l'IP3 engagées dans la transduction olfactive ne sont toujours pas clairement identifiées.

Par ailleurs, il a été suggéré que les variations de l'homéostasie calcique joueraient également un rôle dans la transduction olfactive. Pour cette raison, le calcium a été considéré comme un messager secondaire (Restrepo et al., 1996). Le calcium agit comme un excitateur en renforçant l'effet dépolarisant du courant CNG par ouverture des canaux Chlorure dépendants du calcium. Par la suite, en s'extrudant via un échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$, il permet le retour à une concentration calcique basale et met donc lui-même fin à la réponse (Jung et al., 1994) (Reisert and Matthews, 1998). Une étude récente montre néanmoins que des souris n'exprimant pas de canaux Chlorure dépendants du calcium ne présentent aucune déficience olfactive, ce qui suggère que le rôle de messager secondaire du calcium est peut-être surestimé (Billig et al., 2011). Le calcium inhibe également plusieurs protagonistes de la voie AMPc. Lorsqu'il se lie à la calmoduline, il est capable d'activer la protéine kinase II qui va inhiber l'AC III (Wayman et al., 1995).

Soulignons que les composants des différentes voies de transduction sont détectés concomitamment dans un NSO. Cela suggère que lors de stimulations en mélange, les odorants peuvent agir par des voies différentes, générant dans le même temps activation ou/et

inhibition. L'hypothèse d'une interaction entre les différents voies de transduction reste ouverte (Rawson et al., 1997 ; Vogl et al., 2000).

I.3.5 Activation des récepteurs olfactifs par les odorants

La découverte des gènes des RO a constitué un pas majeur dans l'exploration du fonctionnement du système olfactif périphérique (Buck and Axel, 1991). Depuis, différentes stratégies ont été mises en œuvre pour « désorphaniser » les RO et comprendre les mécanismes qui gouvernent le codage des odeurs au niveau périphérique.

a) Modèles d'étude du répertoire odorant des récepteurs olfactifs

Approches électro-physiologiques

Les deux méthodes électro-physiologiques présentées ci-après permettent d'enregistrer la réponse de neurones dans leur environnement natif et peuvent être utilisées in vivo, sur des animaux anesthésiés, ou ex-vivo, après ablation chirurgicale de l'épithélium olfactif (Chen et al., 2000; Nickell et al., 2007).

La première étude physiologique du fonctionnement de l'EO de mammifère a été menée en 1956 chez le lapin (Ottoson, 1956). Des mesures d'activité électrique appelées électro-olfactogrammes (Falkner et al.), ont été effectuées suite à la présentation d'une substance odorante au niveau de l'épithélium. Une différence de potentiel entre la surface de l'épithélium et une électrode de référence est ainsi mesurée. Cette variation de potentiel est lente, négative, de quelques millivolts d'amplitude et s'inscrit dans une échelle de temps de l'ordre de quelques secondes (Figure 14)

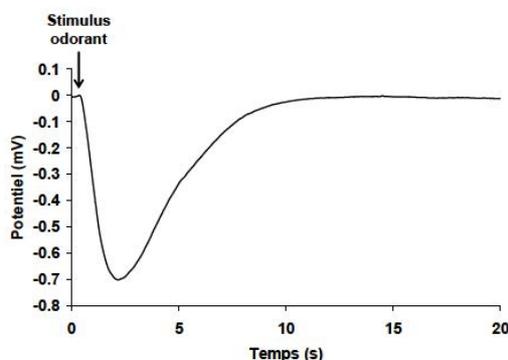


Figure 1 : Exemple caractéristique d'enregistrement d'électro-olfactogramme après une stimulation par un odorant. La dépolarisation observée suite à un stimulus odorant (l'acétate d'isoamyle dans cet exemple) correspond à la somme de potentiels générateurs à la surface des cils olfactifs

La technique d'enregistrement d'EOG permet de mesurer la réponse électrique globale d'environ un millier de neurones olfactifs mais ne permet pas de révéler leur contribution respective à l'élaboration du signal. Afin d'accéder aux réponses individuelles des neurones olfactifs envers les différents stimuli, l'utilisation de microélectrodes de très faible diamètre a permis d'approcher au plus près le corps cellulaire des neurones et d'enregistrer la réponse d'un seul neurone olfactif (enregistrement unitaire) (Duchamp-Viret et al., 2000; Getchell, 1977 ; Kang and Caprio, 1995 ; Trotier and Macleod, 1983).

Grâce à la technique d'enregistrement unitaire sur tissu intact (patch-clamp), plusieurs RO ont pu être désorphanisés, c'est-à-dire que leurs ligands ont été identifiés. Ainsi, après avoir introduit dans la cavité nasale de rat un adénovirus recombinant contenant les gènes codant le récepteur de rat rI7 et une protéine fluorescente, la GFP (green fluorescent protein), des enregistrements en patch-clamp ont permis de démontrer une sélectivité du récepteur rI7 pour l'octanal (Zhao et al., 1998). Par la même méthode, le spectre de réponse des neurones exprimant le récepteur de souris SR1 s'est révélé particulièrement large avec des réponses à des molécules de structures et de fonctions chimiques variées (Grosmaître et al., 2009; Ma et al., 2003). La technique de patch clamp permet d'enregistrer la réponse du neurone à différents niveaux (soma, dendrite et cils) (Delgado and Bacigalupo, 2004) mais elle est difficile à mettre en œuvre en raison de la petite taille des neurones.

Expression hétérologue in vitro

Compte tenu du grand nombre de RO et de la multitude de ligands potentiels, l'idée d'exprimer des RO dans un système cellulaire et de cribler un panel de ligands a été proposée. En effet, l'expression en système hétérologue de nombreux RCPG a abouti à une dissection très précise de leur relation structure-fonction. De nombreux efforts ont ainsi été déployés pour mettre au point cette approche et surmonter divers obstacles. La première expression fonctionnelle d'un RO a été réalisée dans les cellules d'insectes Sf9 après infection par un baculovirus recombinant contenant le gène codant le récepteur OR5 de souris (Raming et al., 1993). Il a été montré que ce récepteur répond préférentiellement au lyral et au lialil. Toutefois la majorité des RO s'est révélée difficile à exprimer à la surface des cellules hétérologues, limitant de ce fait le criblage pharmacologique de ces récepteurs. Il semble que des interactions intra-moléculaires au niveau de la 3^{ème} boucle intracellulaire pourraient être à l'origine de la rétention de ces protéines dans les compartiments intracellulaires (Gimelbrant

et al., 1999). Pour améliorer l'adressage des RO à la membrane dans des cellules de mammifères, il a été proposé de les fusionner avec un peptide signal du récepteur de la rhodopsine et d'exprimer ces constructions dans des cellules humaines rénales embryonnaires, les cellules HEK293 (Kajiya et al., 2001; Krautwurst et al., 1998). En utilisant la technique d'imagerie calcique, Krautwurst et collaborateurs ont ainsi pu montrer que les RO de souris ID3, IC6 et IG7 sont activés respectivement par la carvone, le citronellal et le limonène (Krautwurst et al., 1998). L'expression surfacique des RO est également améliorée lorsqu'ils sont co-transfectés avec d'autres RCPG (récepteurs adrénergique, purinergique ou adénosine) (Bush et al., 2007 ; Hague et al., 2004) ou certaines protéines membranaires. Il a ainsi été montré que les protéines transmembranaires RTP (receptor transporting protein) et REEP (receptor expression enhancing protein), qui s'expriment spécifiquement dans les neurones olfactifs, favorisent l'expression des RO à la surface membranaire des cellules HEK293 (Saito et al., 2004 ; Zhang et al., 2007). Ces protéines seraient impliquées dans différentes fonctions telles que le repliement et/ou le transport des RO depuis le réticulum endoplasmique (Saito et al., 2004). Une autre protéine appelée Ric-8 (resistance to inhibitors of cholinesterase), qui est spécifiquement exprimée dans les NSO, jouerait également un rôle de régulateur positif dans l'activation des RO (Von Dannecker et al., 2005 ; 2006). Cette protéine interagirait avec G α olf mais aussi avec les sous-unités G γ 13, G β et le GTP (Kerr et al., 2008). Ces avancées ont conduit l'équipe de H. Matsunami à élaborer une lignée de cellules HEK293 exprimant de manière stable les protéines G α olf, RTP1, RTP2 et REEP1 et de ce fait, adaptée à l'étude fonctionnelle des RO de mammifères (Saito et al., 2004). Cette lignée, appelée lignée Hana3A, a été utilisée avec succès pour étudier la spécificité d'un grand nombre de RO humains et murins (Saito et al., 2009). Le nombre de RO désorphanisés reste néanmoins encore limité.

b) Codage périphérique de l'information olfactive

L'ensemble des différentes approches décrites précédemment a permis de distinguer deux grands types fonctionnels de RO : les RO à large spectre, généralistes, qui sont activés par un grand nombre de molécules odorantes, et les RO à spectre étroit, spécialistes, qui reconnaissent un petit nombre de ligands (Keller et al., 2007; Saito et al., 2009). Il a par

ailleurs été démontré qu'un odorant a la capacité d'activer plusieurs RO différents et que le nombre de RO activés peut varier en fonction de la concentration de l'odorant. Une molécule induit ainsi la formation d'une carte d'activation de RO qui sera représentative de la molécule et de sa concentration. On estime que si chaque odorant est codé par seulement trois récepteurs, le nombre de molécules qui pourrait être discriminés serait d'environ un milliard (Malnic et al., 1999). Ces caractéristiques ont donné lieu à la théorie du « codage combinatoire » périphérique (**Erreur! Source du renvoi introuvable.**) soutenue par plusieurs études in vitro et électrophysiologiques (Duchamp et al., 1974 ; Kajiya et al., 2001; Malnic et al., 1999 ; Revial et al., 1978).

Lorsque plusieurs odorants sont en mélange, on pourrait s'attendre à ce que le nombre de RO activés par le mélange corresponde à la somme des RO activés par les odorants seuls. Toutefois, des phénomènes de compétition entre molécules agonistes vis-à-vis d'un même RO ont été mis en évidence (Sanz et al., 2005 ; Sanz et al., 2008). Des études ont également montré qu'un même odorant peut avoir un effet agoniste pour un certain nombre de récepteurs et antagoniste pour d'autres récepteurs (Araneda et al., 2000 ; Jacquier et al., 2006; Oka et al., 2004b ; Sanz et al., 2005 ; Spehr et al., 2003). Ces observations suggèrent l'existence d'interactions entre odorants et récepteurs lorsque ceux-ci sont stimulés par des mélanges d'odorants (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). L'encodage des mélanges par le système olfactif est donc certainement plus complexe qu'il n'y paraît et mérite d'être étudié de manière approfondie à chaque étape du traitement du message olfactif, notamment au niveau périphérique.

c) **Evènements péri-récepteurs**

Certains phénomènes, qualifiés d'évènements péri-récepteurs, peuvent avoir une incidence majeure sur la qualité ou l'intensité du signal olfactif. Ces mécanismes, qui favorisent ou au contraire contrecarre l'interaction des ligands avec les RO, ou qui modifient les propriétés des odorants, impliquent des protéines présentes dans l'environnement des RO. Les protéines de liaison des odorants et les enzymes du métabolisme des xénobiotiques sont les principales candidates.

Les protéines de liaison aux odorants

Les protéines de liaison aux odorants (ou OBP, pour odorant binding proteins) sont des petites protéines (17-20 kDa) secrétées dans le mucus olfactif par les glandes de Bowman (Pevsner et al., 1986). Elles ont été décrites chez un grand nombre d'espèces, des insectes aux vertébrés, y compris l'Homme. Ces protéines interviendraient dans différents processus; elles sont de bonnes candidates pour transporter les odorants, qui sont généralement hydrophobes, du mucus nasal vers les RO. Elles seraient également impliquées dans la discrimination olfactive car trois sous-types d'OBP ont été mis en évidence dans le mucus de rat. L'OBP-1 fixe préférentiellement les hétérocycles, l'OBP-2 fixe les longues chaînes carbonées des aldéhydes et des acides gras, alors que l'OBP-3 fixe les cycles saturés ou non (Lobel et al., 2002). D'autres hypothèses ont été proposées concernant le rôle des OBP: celles-ci pourraient soit servir de filtres pour les odorants dans le mucus, et réduire ainsi la concentration des odorants à proximité des RO, soit permettre l'élimination des substances odorantes après activation des RO, soit enfin interagir directement avec les RO (Vidic et al., 2008). Cependant, le mode de "relargage" de l'odorant reste obscur. En effet, on ne sait pas si l'OBP libère l'odorant à proximité des RO ou s'il se forme un complexe entre OBP/odorant et RO. L'identification du rôle exact des OBP fait encore l'objet de nombreuses investigations.

Les enzymes du métabolisme de xénobiotiques

De nombreuses enzymes du métabolisme des xénobiotiques (EMX) ont été mises en évidence dans la MO de mammifères (Ding and Dahl, 2003 ; Heydel et al., 2010). Elles sont exprimées dans les cellules de soutien et les glandes de Bowman, mais aussi au niveau des neurones sensoriels olfactifs. Trois types d'enzymes sont concernées : les enzymes de phase I (essentiellement des cytochromes P450), dites de fonctionnalisation, qui catalysent notamment les réactions d'oxydo-réduction et d'hydrolyse ; les enzymes de phase II (glutathion-S-transférases, UDP glucuronosyltransférases...), dites de conjugaison, qui participent à la transformation du composé en lui ajoutant un groupement hydrophile ; les transporteurs de phase III (multi-drug resistance proteins , multi-drug resistance-associated proteins) qui ont pour fonction d'évacuer hors de la cellule le composé rendu hydrosoluble. Bien que le rôle majeur des EMX soit la protection tissulaire contre les contaminants inhalés, elles seraient aussi impliquées dans la modulation du signal olfactif (Getchell et al., 1993 ; Lazard et al., 1991 ; Thiebaud et al., 2013). En effet, les EMX olfactives pourraient biotransformer les molécules odorantes en métabolites non odorants ou ayant une odeur différente. Il a été montré, chez le rat, que l'amplitude des électro-olfactogrammes EOG, générés par des métabolites de molécules odorantes (coumarine, quinoline et acétate d'isoamyle) est plus faible que l'amplitude des réponses induites par les molécules parentes (Thiebaud et al., 2013). La métabolisation des odorants par ces enzymes permettrait également d'éviter la saturation des RO.

II. Perception des mélanges de molécules odorantes

L'étude de la perception des mélanges d'odeur a débuté par des observations chez l'Homme, c'est-à-dire par des approches psychophysiques. En 1860, pour la première fois, Gustav T. Fechner a défini la *psychophysique* comme étant une science exacte de la relation fonctionnelle entre le monde physique et le monde psychique. Cette science étudie les lois précises reliant les sensations humaines aux stimuli physiques. Il s'agit d'une approche pluridisciplinaire concernant notamment la physiologie et la psychologie.

Dans le cas des odeurs, l'hypothèse principale de l'approche psychophysique est qu'il existe un lien entre les caractéristiques physico-chimiques des odorants et leurs conséquences psychosensorielles. Nous examinerons cette hypothèse sous l'angle des trois caractéristiques principales des odeurs : intensité, qualité et tonalité hédonique. Ces trois dimensions peuvent être modifiées lorsque les odeurs sont perçues en mélange.

II.1 Impact des mélanges sur les principales dimensions des odeurs

II.1.1 La qualité

Les odeurs dont l'intensité dépasse le seuil de reconnaissance sont perçues chacune avec certaine qualité qui confère à l'odeur son identité. Il arrive parfois que des molécules très proches sur le plan de leur structure (ex : énantiomères) procurent deux sensations olfactives différentes: par exemple, la D-carvone sent la menthe tandis que la L-carvone sent le carvi (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Dans le cas d'un mélange, la qualité de l'odeur peut se présenter sous différentes formes. La perception est dite analytique (ou hétérogène) lorsque les qualités propres des constituants du mélange sont perçues, chacun gardant son identité olfactive. Selon Berglund et al. (1976), dans le cas de la perception analytique, le mélange peut avoir l'odeur d'un des composants, ou de l'autre, ou encore des deux simultanément (Berglund et al., 1976). Il a été montré que la qualité d'un mélange dans lequel un composé odorant est majoritaire est celle de ce composé et que pour des mélanges dits iso-intenses, c'est-à-dire contenant deux composés odorants ayant la même intensité, la qualité des deux composés odorants est perçue simultanément (Olsson, 1998). Toutefois les travaux

d'Anatasova (2005a) ont montré que la qualité des mélanges iso-intenses ne correspond pas toujours à une perception équilibrée des notes odorantes des deux constituants du mélange ; on observe alors une dominance perceptive de l'une des qualités sur l'autre (Atanasova et al., 2005a). Ce type d'interaction a également été mis en évidence dans des mélanges plus complexes (Brossard et al., 2007). Il a récemment été estimé que 70% des mélanges d'odorants engendreraient ainsi une dominance qualitative (Ferreira, 2012).

Un autre type de perception, dite synthétique (ou homogène), a été décrit lorsque le mélange d'odorants engendre une nouvelle odeur perçue comme une entité. Dans ce cas, les qualités odorantes propres aux constituants s'associent et fusionnent pour former une nouvelle qualité odorante. La fusion complète des deux notes odorantes est connue en parfumerie et dans l'industrie des arômes alimentaires sous le terme d'« accord aromatique ». Expérimentalement, l'importance des concentrations et de la proportion des composés au sein d'un mélange binaire dans l'apparition de l'accord a été démontrée (Barkat et al., 2012). Ainsi le mélange binaire d'isobutyrate d'éthyle (odeur de fraise) et d'éthyle maltol (odeur de caramel) entraîne l'apparition d'une note odorante spécifique (odeur d'ananas) dans des proportions très précises chez l'Homme (Le Berre et al., 2008a ; Le Berre et al., 2008b). Le même phénomène a été observé chez le lapin nouveau-né qui peut percevoir de manière synthétique le mélange d'isobutyrate d'éthyle et d'éthyle maltol (Coureaud et al., 2011; Coureaud et al., 2009 ; Coureaud et al., 2008).

II.1.2 L'intensité

Une odeur n'est perceptible que si les molécules qui la portent atteignent une concentration suffisante au voisinage des neurones de la muqueuse olfactive. Généralement, l'intensité de l'odeur croit lorsque la concentration des molécules odorantes augmente. Toutefois l'intensité et la qualité ne sont pas des dimensions indépendantes : une molécule pure peut présenter des qualités olfactives différentes selon son intensité. Par exemple, l'indole a une odeur de jasmin à faible concentration et une odeur fécale à forte concentration.

Dans le cas des mélanges d'odeurs, toutes les études psychophysiques s'accordent pour conclure que l'intensité odorante du mélange n'est pas la somme arithmétique des intensités des constituants. Ainsi, l'intensité du mélange peut être supérieure ou inférieure à la

somme des intensités de ces composés pris individuellement (Atanasova et al., 2005a ; Chaput et al., 2012). Il a été montré chez l'Homme que l'ajout de concentrations élevées de la Whisky lactone (WL) à de l'acétate d'isoamyl (ISO) conduit à une diminution de l'intensité perçue de ce dernier. En revanche, l'addition de faibles concentrations de WL augmente l'intensité perçue de la note fruitée portée par l'ISO dans le mélange (Chaput et al., 2012).

Berglund et collaborateurs (1976) ont proposé une classification des effets quantitatifs induits par les mélanges d'odeur selon la nature de la perception. Ces différents effets sont représentés dans la Figure 17. Pour les mélanges homogènes (synthétiques), l'intensité odorante du mélange peut être plus forte, égale ou moins forte que la somme des intensités des composants du mélange pris isolément. Ces trois effets sont définis respectivement par les termes suivants : *hyper-addition*, *addition complète* et *hypo-addition*. On peut distinguer trois cas d'*hypo-addition*. Lorsque l'intensité du mélange est supérieure à la plus forte intensité de chacun des composants du mélange mais inférieure à la somme des intensités de ceux-ci, il s'agit de *l'addition partielle*. Si l'intensité du mélange est intermédiaire entre les intensités des composés hors mélange, c'est un effet de *compromis*. Enfin, si l'intensité du mélange est inférieure à la plus faible intensité des composés purs, on parle de *soustraction*.

Pour les mélanges hétérogènes (analytiques), Berglund et al., 1976 ont comparé l'intensité de l'odeur d'un des composants dans le mélange et hors de celui-ci. Il est en effet plus difficile de prendre compte l'intensité globale du mélange car les qualités des composants individuels restent perceptibles. Lorsque l'intensité perçue de l'un des composants en mélange est supérieure à l'intensité du même composant perçue en dehors du mélange, on est en présence d'un phénomène de *synergie*. On parle d'indépendance lorsque les intensités des composants perçues en mélange sont identiques aux intensités de ces composants perçues en dehors du mélange. Enfin, lorsque l'intensité perçue d'un des composants diminue en mélange, le phénomène est appelé antagonisme (ou soustraction). Le phénomène le plus couramment observé est l'hypo-addition (Ferreira et al 2012). Des cas de synergie ont été décrit par plusieurs auteurs et semble se produire dans des mélanges où l'intensité de l'odeur des composés est faible (Atanasova et al., 2005b)

Composés hors Mélange	Odorant A	R_A	
	Odorant B	R_B	
Mélange homogène	Hyper-addition	$R_M > R_A + R_B$	
	Adition complète	$R_M = R_A + R_B$	
	Hypo-addition	Adition partielle	$R_A < R_M < R_A + R_B$
		Compromis	$R_B < R_M < R_A$
Soustraction		$R_M < R_B$	
Mélange hétérogène	Synergisme pour A Indépendance pour B	$R_{MA} > R_A$ $R_{MB} = R_B$	
	Indépendance pour A Indépendance pour B	$R_{MA} = R_A$ $R_{MB} = R_B$	
	Antagonisme pour A Indépendance pour B	$R_{MA} < R_A$ $R_{MB} = R_B$	

Figure 2 : Les différents effets de mélanges sur la perception de l'intensité, d'après (Thomas-Danguin, 1997).

Abréviations : $R_{A(B)}$: intensité du composé A(B); R_M : intensité totale du mélange homogène; $R_{MA(B)}$: intensité du composé A(B) dans le mélange hétérogène.

II.1.3 La tonalité hédonique

La troisième dimension de l'odeur, la tonalité hédonique, ou affective, que l'on ressent selon une polarité plaisant/déplaisant, accompagne très régulièrement la sensation olfactive. Il est intéressant de noter que cette dichotomie semble être relativement partagée, même entre espèces (Mandairon et al., 2009). Bien que plusieurs études aient démontré que la perception hédonique des odeurs est fortement influencée par l'expérience et l'apprentissage (Barkat et al., 2008; Stagnetto et al., 2006), la culture (Chrea et al., 2005) et le sexe (Brand and Millot, 2001), d'autres études suggèrent que la valence hédonique des molécules odorantes reste en partie dépendante des propriétés physico-chimiques des odorants. Par exemple, il est connu que la présence de l'atome de soufre induit une perception déplaisante (Brand et al., 2012; Khan et al., 2007). L'intensité du stimulus joue aussi un rôle important dans la détermination de la préférence. Il semble qu'il y ait un niveau optimal de stimulation pour chaque individu,

qui dépend de l'intensité perçue. En général, les odeurs jugées désagréables à faible intensité le sont encore davantage lorsque la concentration de l'odorant augmente.

La plupart des odeurs que nous rencontrons sont des mélanges d'odorants qui peuvent contenir des composants affectivement positifs et négatifs. Des interactions complexes entre les composants peuvent être observées. Ainsi, lorsqu'une petite quantité d'un odorant ayant une odeur désagréable est ajoutée à un odorant ayant une odeur agréable, le mélange obtenu peut rester agréable, ou au contraire, peut devenir désagréable. Un exemple frappant est celui du jasmin qui a un parfum doux et floral. La fleur de jasmin « *Jasminum grandiflorum* » contient naturellement 2-3% d'indole, un produit classé comme désagréable. Malgré cela, la valeur hédonique d'un mélange comprenant un sous-mélange de 8 constituants plaisants du jasmin et un odorant déplaisant (indole) est jugée agréable (Grabenhorst et al., 2007).

II.2 Les différents niveaux d'intégration des signaux

Les effets des mélanges décrits ci-dessus montrent qu'il est très difficile de prédire les caractéristiques psychophysiques des mélanges sur la base de celles des composants. Ces effets résultent d'interactions qui se produisent probablement à différents niveaux de traitement de l'information chimique dans le système olfactif (Berglund et al., 1976) et (Frijters, 1987) ont proposé différents niveaux d'intégration possibles. Certaines interactions pourraient avoir lieu dès le premier niveau de réception des stimuli olfactifs, voire avant, tandis que d'autres surviennent probablement à un niveau plus central.

II.2.1 Niveau pré-sensoriel

Le premier niveau d'interactions défini par (Berglund et al., 1976) et (Frijters, 1987) concerne les réactions chimiques ou les interactions physico-chimiques qui peuvent se produire entre les constituants du mélange et provoquer de ce fait un changement de la nature des stimuli. Les réactions chimiques peuvent entraîner l'apparition des nouvelles molécules qui peuvent modifier la perception des odeurs. Elles se produisent généralement en solution, comme dans le cas de la maturation des parfums, mais il est peu vraisemblable que des réactions chimiques entre odorants puissent se produire à l'état gazeux dans des conditions normales de température et de pression (Thomas-Danguin, 1997).

II.2.2 Niveau périphérique

Le deuxième niveau d'interactions proposé par Berglund et al., 1976 concerne les interactions qui peuvent se produire au niveau périphérique, c'est-à-dire au niveau des neurones sensoriels olfactifs (NSO). Les NSO cumulent les fonctions de réception du stimulus, de transduction et de transmission des signaux sensoriels périphériques vers le BO, premier relais cérébral de traitement de l'information olfactive chez les mammifères. Plusieurs études électro-physiologiques et d'imagerie calcique ont mis en évidence, chez plusieurs espèces, divers phénomènes (additivité, synergie, suppression) au niveau des neurones stimulés par des mélanges binaires (Araneda et al., 2000 ; Araneda et al., 2004 ; Chaput et al., 2012 ; Cromarty and Derby, 1998 ; Deisig et al., 2012 ; Duchamp-Viret et al., 2003 ; Munch et al., 2013; Rospars et al., 2008). Des effets de suppression ont majoritairement été observés. Ces différents effets peuvent être dus à l'existence d'interactions se produisant au niveau des RO et/ou au niveau des voies de transduction du signal olfactif.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, il est aujourd'hui bien établi que les molécules odorantes peuvent avoir plusieurs récepteurs cibles en commun. Des interactions peuvent donc se produire lorsque des molécules odorantes en mélange activent les RO. Des mécanismes de compétition entre deux molécules agonistes (molécules activatrices) ou bien entre une molécule agoniste et une molécule antagoniste (molécule non activatrice) peuvent notamment avoir lieu au niveau d'un même récepteur (Neubig et al., 2003). Dans ce dernier cas, il est généralement admis que la molécule antagoniste se fixe sur le récepteur sans pour autant induire le changement de conformation nécessaire à l'activation de la protéine G. Il en résulte une inhibition, voire un blocage total de l'activation du récepteur par la molécule agoniste. Quelques études menées *in vitro*, dans des systèmes hétérologues exprimant des RO, ont montré qu'un odorant peut inhiber la réponse d'un récepteur à un autre odorant (Jacquier et al., 2006; Oka et al., 2004a ; Sanz et al., 2005 ; Sanz et al., 2008 ; Shirokova et al., 2005 ; Spehr et al., 2003). Ainsi Spehr et collaborateurs ont montré que le bourgeonal active le récepteur humain OR17-4 tandis que l'undécanal n'induit aucun effet (Spehr et al., 2003). Par contre, lorsque ce récepteur est stimulé par les 2 molécules en mélange, une inhibition de l'activation de ce récepteur est observée, indiquant que l'undécanal agit comme un antagoniste. De même, Sanz et collaborateurs ont identifié plusieurs antagonistes du récepteur

humain OR1G1, certains étant à la fois agonistes et antagonistes tandis que d'autres sont dépourvus d'activité agoniste (Sanz et al., 2005 ; Sanz et al., 2008).

La coexistence de différentes voies de transduction du signal peut aussi expliquer les effets observés au niveau des neurones. Les constituants d'un mélange pourraient agir par des voies différentes, générant dans le même temps activation et inhibition. Vogl et collaborateurs ont montré, sur des NSO de rat, que les voies AMPc et IP3 ne fonctionnent pas indépendamment mais qu'il existerait une régulation négative (Vogl et al., 2000). Des études récentes suggèrent également l'implication d'une enzyme, la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) dans la modulation du signal olfactif chez les mammifères (Ache, 2010) (Ukhanov et al., 2010). L'activation de la PI3K produit le phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PIP3) à partir du PIP2. Le PIP3 régulerait négativement les canaux CNG en perturbant les interactions entre l'extrémité N terminale (Brady et al., 2006). Certains odorants pourraient activer la PI3K et ainsi provoquer des effets inhibiteurs lorsqu'ils sont en mélange avec des molécules excitatrices (Figure 18) (Ukhanov et al., 2011).

Il est également possible que certaines protéines impliquées dans les événements péri-récepteurs (OBP et EMX) jouent un rôle significatif dans la régulation du signal lorsque le système olfactif est stimulé par des molécules odorantes en mélange. Aucune donnée n'a été publiée dans ce domaine.

II.2.3 Niveau du bulbe olfactif

Le bulbe olfactif (BO) reçoit les projections des NSO et participe au codage et au traitement du signal olfactif. La spécificité des projections épithélio-bulbaires induit une organisation spécifique des entrées du BO. L'implication de cette organisation dans le codage de l'information olfactive a été étudiée par des techniques d'imagerie telles que le marquage calcique ou l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) (Martin et al., 2007 ; Wachowiak and Cohen, 2001). Ces techniques ont montré qu'une odeur possède une représentation spatiale puisqu'elle entraîne l'activation d'un groupe spécifique de glomérules dans le BO ; les patrons d'activation sont bilatéraux, symétriques et très similaires d'un animal à un autre pour une odeur donnée mais spécifique à chaque molécule (Pain et al., 2011; Rubin and Katz, 1999). Les études fonctionnelles par imagerie ont démontré que l'information olfactive repose sur l'organisation chimiotopique du BO, c'est-à-dire que les molécules partageant des groupes fonctionnels, une structure ou des propriétés moléculaires (solubilité par exemple) similaires activent des glomérules proches (Johnson and Leon, 2007; Rubin and Katz, 1999). Chez les insectes, il semble qu'il existe également une organisation chimiotopique des lobes antennaires (Chandra and Singh, 2005 ; Jefferis, 2005).

En effet, lors de l'activation du système olfactif par un mélange binaire, les NSO ayant une affinité plus faible pour une composante du mélange activent des glomérules secondaires. L'activation de ces glomérules moins spécifiques augmente en fonction de la concentration en molécules odorantes (Wachowiak and cohen, 2003). Lorsqu'une molécule odorante est mélangée à concentration égale à une autre molécule possédant les mêmes propriétés physico-chimiques, le mélange induit une addition linéaire des glomérules activés par chacune des molécules (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**) (Belluscio and Katz, 2001 ; Fletcher, 2011). Il a été montré que la répartition spatiale de l'activité glomérulaire peut refléter les propriétés qualitatives d'un mélange binaire. Par exemple, des souris entraînées à identifier des mélanges contenant différents ratios de pentanal et d'hexanal ne reconnaissent que l'hexanal quand ce dernier est majoritaire dans le mélange. Conformément à ces réactions comportementales, le patron d'activation des glomérules en réponse à ces mélanges est semblable à celui produit par l'hexanal seul (Grossman et al., 2008). Même si l'étude de la carte spatiale reste plausible pour un mélange simple de quelques molécules, il est difficile de penser qu'un mélange complexe évoque au niveau du BO l'addition simple de tous les glomérules répondant à chacun de ces composants.

De manière concomitante au codage spatial, le traitement de l'information olfactive fait également intervenir un codage temporel. Les indices temporels de l'activité neuronale pourraient être associés à la qualité et l'intensité de l'odeur. Ce codage peut être analysé au niveau du BO ainsi qu'au niveau des neurones en mesurant l'expression de plusieurs rythmes qui se traduisent par différentes gammes de fréquence (rythmes lent (1-10 Hz), rapide β (15-30 Hz) ou rapide γ (40-90 Hz). Ces patrons oscillatoires dépendent de la concentration de l'odeur et de sa pression de vapeur (Cenier et al., 2008; Uchida et al., 2000) ainsi du débit d'air dans le nez (Courtiol et al., 2011).

Le concept d'assemblées de cellules – et donc de *codage temporel* - utilise la synchronisation comme une dimension supplémentaire. Il ne s'agit pas d'une alternative, mais d'un complément au traitement qui utilise le changement de l'activité neuronale. La combinaison des stratégies de codage spatial et temporel a été étudiée chez le papillon de nuit (*Manduca sexta*) en le stimulant par un mélange de 9 odorants reproduisant l'odeur d'une plante dont se nourrit le papillon (Riffell et al., 2009). Par des tests comportementaux, il a été montré que 3 odorants en mélange initialement présents dans le mélange de 9 odorants entraînent le même comportement de recherche alimentaire que le mélange artificiel de 9 odorants et celui naturel contenant 60 odorants. Les auteurs ont montré par des enregistrements électrophysiologiques effectués dans le lobe antennaire que l'addition des patrons d'activité induits par chacun des 3 odorants diffère du patron engendré par leur mélange et que le codage du mélange est organisé par une activité synchronisée répartie sur une population de glomérules. Cette combinaison permet donc de tirer beaucoup plus d'informations d'un seul pattern d'activité neuronale et, de ce fait, d'augmenter la dynamique, la flexibilité et la force représentationnelle d'un système distribué tel que le BO.

II.2.4 Niveau du cortex piriforme

Le cortex piriforme (CP) n'est pas une structure homogène. Ses parties antérieure et postérieure diffèrent dans leur organisation. Alors que la partie antérieure reçoit d'abondantes projections du BO, la partie postérieure reçoit surtout les branches collatérales des cellules pyramidales du cortex antérieur. Une étude d'imagerie par IRMf a montré chez l'Homme que ces différences d'organisation recouvrent des différences fonctionnelles (Gottfried et al., 2006). Gottfried et collaborateurs ont ainsi mis en évidence une double dissociation dans le CP : les régions postérieures codent la qualité (mais pas la structure) et les régions antérieures codent la structure (mais pas la qualité) (Gottfried et al., 2006). La conservation d'un codage basé sur la structure à l'entrée du CP suggère une fidélité de l'information sensorielle provenant du BO. Le codage basé sur la qualité est indépendant de toute configuration moléculaire simple, ce qui implique que les mécanismes de génération du code qualitatif reposent vraisemblablement sur une connaissance de l'odeur par l'individu, donc à un processus mnésique. Ainsi, des travaux menés par cette équipe ont confirmé que plus les patrons d'activation de cette région sont proches, plus la qualité des molécules odorantes est similaire (Howard et al., 2009) (Howard et al., 2009). De plus, la modification de la valence d'une odeur après apprentissage aversif au choc électrique entraîne une modification des patrons d'activation cérébrale au sein du CP (Li et al., 2008). Gottfried et al. (2002) ont observé que les patrons temporels de réponse aux odeurs diffèrent selon la valence hédonique de l'odeur (Gottfried et al., 2002). Ils ont noté que l'activité du CP antérieur induite par l'odeur plaisante est soutenue tandis que celle induite par l'odeur déplaisante diminue rapidement avec le temps. Ces auteurs suggèrent que cette dissociation fonctionnelle reflèterait des différences physiologiques dans l'encodage de l'information olfactive. L'implication du CP dans le codage des odeurs, notamment issues de mélanges, a été confirmée par d'autres études. Par la technique de l'IRMf, Grabenhorst et collaborateurs ont étudié comment le CP interprète la valeur hédonique d'un mélange sentant le jasmin et comprenant un sous-mélange plaisant (mélange de 8 constituants) et un odorant déplaisant (indole). Ils ont montré que le signal généré par le mélange est supérieur à ceux générés par ses constituants (Grabenhorst et al., 2007). D'autres études ont porté sur le rôle du CP dans la catégorisation et la discrimination des mélanges d'odeurs. Chez le rat, une étude a mis en évidence que des neurones du CP antérieur sont capables de répondre à un mélange mais aussi à l'une des molécules du mélange (Kadohisa and Wilson, 2006). Néanmoins ces auteurs montrent qu'après un

entraînement ayant pour but d'augmenter la discrimination entre le mélange et ses composantes, les neurones du CP répondent soit au mélange soit à l'un des constituants.

II.2.5 Niveau central

Au niveau central, les interactions peuvent survenir dans différentes parties du système nerveux central lors du traitement de l'information olfactive. Des études d'imagerie *in vivo* chez l'Homme ont montré que la perception olfactive active un réseau neuronal complexe qui inclut le cortex orbito-frontal, l'amygdale, l'hypothalamus, le cortex entorhinal, le thalamus et le cervelet, mais l'activation de chacune des aires de ce réseau est dépendante de la tâche que doit effectuer l'individu (évaluation de la qualité, de l'intensité ou de la tonalité hédonique) (Anderson et al., 2003 ; Boyle et al., 2009 ; Grabenhorst et al., 2007). Très peu d'études se sont intéressées aux mécanismes centraux impliqués dans la perception des mélanges d'odeurs. L'une d'elles avait pour but de rechercher si des odeurs induites par des stimuli monomoléculaires (citral et pyridine) et des mélanges binaires contenant différentes proportions de ces odorants activaient des régions différentes du cerveau (Boyle et al., 2009). Les résultats ont révélé que les mélanges binaires étaient traités différemment de leurs constituants. Le mélange active certaines zones des cortex cingulaire gauche, pariétal droit et frontal supérieur, ainsi que des zones du cortex orbitofrontal antérieur et latéral de façon bilatérale. Ils ont constaté aussi une activation du cortex orbitofrontal antérieur et latéral par les mélanges alors que les composantes du mélange induisaient une désactivation de ces régions. Ces auteurs suggèrent que la portion antérieure du cortex orbitofrontal agit comme un « détecteur » de mélanges (Boyle et al., 2009). Dans leur étude sur l'odeur de jasmin Grabenhorst et al (2007) ont constaté que leur mélange contenant 8 odorants ayant une odeur agréable et un odorant ayant une odeur désagréable induit l'activité de deux zones cérébrales distinctes : une zone proche de celle stimulée par les odorants ayant une odeur agréable (cortex orbitofrontal médian), qui serait donc plus particulièrement dédiée au traitement hédonique positif des odeurs, et une autre zone proche de celle activée par l'odorant désagréable (partie dorsale du cortex cingulaire antérieur et région postérieure du cortex midorbitofrontal, insula agrulaire), qui serait plutôt vouée au traitement hédonique négatif des odeurs. Selon les auteurs, le cerveau peut simultanément appréhender la valeur hédonique positive et négative d'un même stimulus complexe (Grabenhorst et al., 2007).

Dans un contexte de mise en situation, la culture (Chrea et al., 2004), l'expertise (Chollet and Valentin, 2000) ou encore les connaissances et aptitude langagières et sémantiques (Rouby et al., 2005) peuvent également modifier les représentations olfactives et être à l'origine de la traduction comportementale des interactions perceptives. Au final, toutes ces interactions qui peuvent se produire aux différents étages du système olfactif peuvent moduler, à des degrés divers l'intégration du signal chimique de départ.

Objectif et démarche expérimentale

L'ensemble des données que nous avons présenté dans la synthèse bibliographique indique que les mélanges d'odeurs peuvent produire des percepts qualitativement et quantitativement différents des odeurs qui les composent et que l'intégration de l'information portée par les molécules odorantes au sein des différents niveaux du traitement du signal olfactif peut contribuer à la formation de l'image sensorielle olfactive. Malheureusement, la connaissance des mécanismes aussi bien physiologiques que cérébraux et comportementaux de l'olfaction est encore très parcellaire. Actuellement il est impossible de prévoir de manière fiable la qualité et l'intensité de l'odeur d'un mélange, même lorsqu'il ne contient que deux composants dont on connaît les caractéristiques olfactives. Un nombre croissant de preuves expérimentales contribuent à étayer le rôle d'interactions générées par les mélanges de molécules odorantes au niveau des RO dans la mesure où cette étape du codage olfactif constitue la base de l'information traitée ensuite par les niveaux plus centraux. Plusieurs études suggèrent ainsi que les caractéristiques perceptives des mélanges (qualité, intensité et hédonicité) vont ainsi dépendre des mécanismes de compétition ou d'additivité qui peuvent avoir lieu à ce niveau.

Ce projet de thèse a pour but d'explorer les mécanismes périphériques qui soutiennent la perception des mélanges de molécules odorantes. L'objectif est d'étudier les réponses des RO à des molécules seules ou en mélanges binaires et de voir dans quelle mesure les interactions observées au niveau des récepteurs (compétition, synergie...) sont corrélées avec des réponses comportementales observées en psychophysique chez l'Homme ou encore avec des données issues d'observations comportementales ou de mesures électrophysiologiques chez le rat. Cette double approche devrait permettre de contribuer à une meilleure caractérisation des mécanismes du codage périphérique des odeurs et d'évaluer le poids de ce codage périphérique dans la construction de l'image sensorielle olfactive. En cela, ce projet participe à l'amélioration des connaissances relatives aux mécanismes biologiques qui sont à la base de notre représentation des caractéristiques sensorielles des aliments que nous décidons de consommer, ou non.

Nous avons évalué les propriétés de trois mélanges binaires :

- le mélange Octanal (odeur herbacée) / Citronellal (odeur de citronnelle) : ce mélange nous a paru particulièrement intéressant car des données publiées dans la littérature scientifique laissent penser que ce mélange induit des effets perceptifs différents (perception analytique ou synthétique) chez le rat (Kay et al., 2003) et un effet de masquage chez l'Homme (Burseg and de Jong, 2007).
- le mélange Octanal (odeur herbacée) / Méthional (odeur de bouillon de légumes) : il a été montré que ce mélange peut induire un effet de masquage chez l'Homme (Burseg and de Jong, 2009).
- le mélange Whiskey lactone (odeur boisée) / Acétate d'isoamyle (odeur fruitée rappelant la banane) : ce mélange a également été étudié car des études sensorielles chez l'Homme ont montré qu'il induit des phénomènes de masquage et de synergie en fonction des proportions des composants dans le mélange (Atanasova et al., 2005a).

Dans la première partie de cette thèse, nous avons étudié l'interaction des mélanges binaires d'aldéhydes (Octanal/Citronellal et Octanal/Méthional) avec des récepteurs olfactifs humains et de rat par imagerie calcique.

Dans une seconde partie, nous avons effectué des mesures d'électro-olfactogramme au niveau de la muqueuse olfactive de rat afin d'évaluer si les interactions induites par les mélanges d'aldéhydes au niveau des récepteurs olfactifs se traduisent par des interactions comparables au niveau d'un ensemble de neurones.

Dans la troisième partie, les résultats des études psychophysiques réalisées chez des sujets humains pour les mélanges d'aldéhydes sont présentés. Les caractéristiques psychophysiques de ces mélanges ont été évaluées en termes d'interactions quantitatives et qualitatives et de valence hédonique.

La dernière partie présente, sous la forme d'une publication, les résultats obtenus pour le mélange Whiskey lactone/Acétate d'isoamyle. Ce travail a été mené en collaboration avec l'équipe de Patricia Viret (CNRS, Lyon) et a fait l'objet d'un article publié en 2012.

Chapitre I : Activation des récepteurs olfactifs par des mélanges binaires d'aldéhydes

I. Introduction

L'étude de la perception des mélanges de composés odorants chez l'Homme ou chez les animaux a mis en évidence que certains mélanges de composés odorants sont perçus de manière analytique ; dans ce cas, la qualité spécifique des odorants reste perceptible au sein du mélange (Eschbach et al., 2011; Laska and Hudson, 1993 ; Linster and Cleland, 2004). Au contraire, d'autres mélanges sont traités par le système olfactif de façon synthétique. Ce processus permet de réduire la complexité chimique et de ne percevoir qu'une entité unique pour l'ensemble du mélange dont la qualité diffère souvent des qualités individuelles de chaque composé du mélange (Jinks and Laing, 2001; Laing and Francis, 1989). Chez l'Homme, il a été montré que le mélange d'isobutyrate d'éthyle (odeur de fraise) et d'éthyle maltol (odeur de caramel) est perçu de façon synthétique et entraîne l'apparition d'une qualité odorante « ananas » spécifique au mélange (Le Berre et al., 2008a). De manière remarquable, ce mélange est également perçu de manière synthétique chez le lapin nouveau-né (Coureaud et al., 2009). En revanche, tout mélange binaire d'une odeur de fraise et de caramel n'est pas susceptible de provoquer l'apparition de l'odeur d'ananas, ce qui souligne l'importance des composés chimiques mis en jeu (Barkat et al., 2012). Par ailleurs, la proportion des composés dans le mélange est également déterminante de la mise en place de la perception synthétique, aussi bien chez l'Homme (Le Berre et al., 2008b) que chez le lapin (Coureaud et al., 2011). L'importance des proportions des constituants du mélange sur l'aptitude à percevoir ce dernier de manière synthétique a également été observée chez le rat dans le cas du mélange de citronellal et d'octanal (Kay et al., 2005). En effet, lorsque le ratio de concentration de ces deux molécules est proche de 50%, les rats perçoivent le mélange de manière synthétique, ce qui n'est pas le cas pour d'autres ratios.

En ce qui concerne les propriétés quantitatives des mélanges d'odeurs, les études électrophysiologiques et comportementales ont montré que très souvent, l'intensité olfactive d'un mélange est différente de la simple somme arithmétique de l'intensité perçue de chaque composant du mélange. Elle peut être supérieure (on parle de synergie ou hyper-addition) ou inférieure (on parle d'hypo-addition) à cette somme (Atanasova et al., 2005a ; Duchamp-Viret et al., 2003 ; Ferreira, 2012; Laing and Jinks, 2001). Par exemple, chez l'Homme, il a été montré que le mélange d'acétate d'isoamyle (odeur fruité de banane) et de whisky lactone (odeur boisée) peut engendrer des phénomènes d'hypo-addition ou de synergie selon la

proportion des deux composés dans le mélange (Atanasova et al., 2004). De même, des phénomènes de masquage ont été décrits dans la perception des mélanges de citronellal et d'octanal chez le rat (Kay et al., 2005). Lorsque le citronellal est largement majoritaire dans le mélange, il masque l'odeur de l'octanal tandis que lorsque l'octanal devient majoritaire, celui-ci masque partiellement l'odeur de citronellal.

Les aldéhydes semblent tenir une place particulièrement importante dans l'activation du système olfactif. Chez les rongeurs, il a été montré qu'un grand nombre de NSO est activé par des aldéhydes et qu'environ 40% de ces NSO répondent au moins à deux aldéhydes (Araneda et al., 2004 ; Nara et al., 2011). Cela suggère que des interactions peuvent se produire au niveau de ces NSO lorsque ceux-ci sont stimulés par des mélanges d'aldéhydes. Il existe dans la littérature quelques études allant dans ce sens. Ainsi, des études menées sur des NSO de rat exprimant le récepteur r17 ont démontré que des aldéhydes cycliques, caractérisés comme étant de faibles agonistes, sont capables d'inhiber l'activation de ce récepteur par l'octanal, son ligand le plus puissant (Peterlin et al., 2008). De même, le citral, un aldéhyde ramifié insaturé, inhibe la réponse des NSO exprimant r17 à l'octanal (Araneda et al., 2000). Au niveau perceptif, des études comportementales et psychophysiques ont révélé que des mélanges d'aldéhydes sont perçus différemment, à la fois qualitativement et quantitativement, des molécules perçues hors mélange. Nous avons vu que chez le rat, le mélange contenant de l'octanal et du citronellal peut être perçu de façon synthétique ou peut entraîner un phénomène de masquage selon les ratios de concentration de ces deux aldéhydes dans le mélange (Kay et al., 2005). Or il est intéressant de rappeler que ces deux aldéhydes sont des agonistes du récepteur olfactif r17 de rat. Dès lors, on peut se poser la question d'une éventuelle interaction entre ces deux molécules vis-à-vis de ce récepteur, interaction qui pourrait contribuer à expliquer les phénomènes observés au niveau intégré. Chez l'Homme, des études réalisées avec ces deux composés ont révélé un effet de masquage du citronellal par l'octanal (Burseg and de Jong, 2007), mais aussi un masquage du méthional, un autre aldéhyde, par l'octanal (Burseg and de Jong, 2009), de sorte qu'on peut également faire l'hypothèse d'une interaction entre ces composés vis-à-vis des RO humains.

Ces résultats soulèvent donc la question de savoir comment des mélanges d'odorants présentant des structures similaires interagissent au niveau des RO. Nous avons étudié cette question en mesurant les réponses de RO stimulés par des mélanges binaires d'aldéhydes.

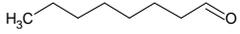
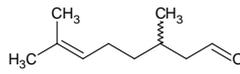
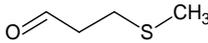
Nous nous sommes intéressés aux deux mélanges dont nous avons décrit les propriétés précédemment, à savoir le mélange octanal + citronellal (Oct + Cit) et le mélange octanal + méthional (Oct + Méth). Les RO ont été co-exprimés avec la protéine G α 16 de manière transitoire dans un système d'expression hétérologue, les cellules humaines HEK293. Quatre RO humains, OR1G1, OR52D1, OR1A1 et OR2W1 ainsi qu'un récepteur de rat, rI7, connus pour répondre aux aldéhydes, ont été sélectionnés pour cette étude (Saito et al., 2009; Sanz et al., 2005 ; Schmiedeberg et al., 2007). L'activation de ces RO par une large gamme de concentrations d'Oct, de Cit et de Méth appliqués séparément ou en mélanges binaires a été mesurée par imagerie calcique.

II. Matériels et méthodes

II.1 Odorants

Les caractéristiques des odorants utilisés dans cette étude sont résumées dans le Tableau 1. Les molécules ont été obtenues auprès de la société Sigma-Aldrich. Les solutions mères des odorants (100 mM) ont été préparées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et stockées à -20°C.

Tableau 1 : Caractéristiques des molécules odorantes étudiées.

Molécules odorantes	Structures	Formule chimique	N° CAS	Poids moléculaire	Odeur
Octanal (Oct)		C ₈ H ₁₆ O	124-13-0	128,21	herbe
Citronellal (Cit)		C ₁₀ H ₁₈ O	106-23-0	154,25	citronnelle
Méthional (Méth)		C ₄ H ₈ OS	3268-49-3	104,17	bouillon de légumes

II.2 Amplification des plasmides

Les constructions plasmidiques contenant les ADNc des gènes codant les récepteurs OR1G1 et OR52D1, ainsi que la protéine Gα16 (pCMV-Rho-OR1G1, pCMV-Rho-OR52D1 et pcDNA3.1/HygroGα16) ont été gracieusement fournies par le Dr. L. Briand (CSGA, Dijon). Les vecteurs contenant les gènes des récepteurs OR1A1 et OR2W1 (pCI-Rho-OR1A1 et pCI-Rho-OR2W1) construits par le Dr. H. Matsunami ont été obtenus auprès de la Société Addgene (Cambridge, USA). Le vecteur contenant le gène codant le récepteur rI7 (pCI-Rho-Flag-rI7) a été fourni par le Dr T.H. Park (National University, Seoul, Corée). Les plasmides contenant les gènes codant les facteurs accessoires (pCI-RTP1S et pMyr-FLAG-Ric-8A) ont été fournis par les équipes du Dr H. Matsunami (Duke University Medical Center, Durham, USA) et du Dr K. Touhara (Université de Tokyo, Japon).

Des bactéries thermocompétentes *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen/Life Technologies) ont été utilisées pour produire les différents plasmides en quantité. Elles ont été transformées par choc thermique pendant 45 secondes à 42°C avec les plasmides. Après croissance sur gélose supplémentée par un antibiotique de sélection (kanamycine 30 μ g/mL ou ampicilline 100 μ g/mL) (Tableau 2), une culture de 5 mL de Luria Broth (LB) additionnée d'antibiotique a étéensemencée par une colonie de bactéries transformées, puis incubée à 37°C sous agitation (300 rpm). Huit heures plus tard, 50 μ L de cette culture ont été introduits dans 25 mL de LB supplémentés en antibiotique. L'ensemble a été incubé à 37°C sous agitation (300 rpm) pendant 16 heures. Les plasmides ont été extraits des bactéries grâce au Qiafilter plasmid midi kit (Qiagen) suivant les instructions du fournisseur. Un séquençage a été réalisé par la société Beckman Coulter Genomics (France) afin de vérifier la pureté des plasmides. Après quantification de l'ADN, les solutions de plasmides ont été stockées à -20°C.

Tableau 2 : Antibiotiques de sélection utilisés pour la croissance des bactéries transformées.

Plasmides	Antibiotique de sélection
pcDNA3.1/HygroG α 16	ampicilline
pCI-RTP1S	ampicilline
pMyr-FLAG-Ric-8A	ampicilline
pCI-Rho-OR1A1	ampicilline
pCI-Rho-OR2W1	ampicilline
pCI-Rho-Flag-rI7	ampicilline
pCMV-Rho-OR1G1	kanamycine
pCMV-Rho-OR52D1	kanamycine

II.3 Culture cellulaire

Les plasmides contenant les gènes des RO ont été transfectés de manière transitoire dans des cellules HEK293. Cette lignée résulte de la transformation de cellules rénales embryonnaires humaines (Graham et al., 1977) obtenues à partir d'un fœtus avorté. Durant de nombreuses années, on a considéré que les cellules HEK293 étaient d'origine épithéliale. En réalité, leur origine serait neuronale car l'équipe de Graham a montré ces cellules possèdent des propriétés semblables à celles des neurones immatures présents dans le rein embryonnaire (Shaw et al., 2002). Les cellules HEK293 sont largement utilisées comme système

d'expression, permettant ainsi l'étude d'un nombre important de RCPG. Comme toutes les cellules, elles expriment de manière endogène différents canaux ioniques tels que des canaux potassiques (Avila et al., 2004 ; Jiang et al., 2002), sodiques (Cummins et al., 1993 ; Ukomadu et al., 1992), calciques (Berjukow et al., 1996), et chlorures (Yu and Kerchner, 1998 ; Zhu et al., 1998).

Les cellules que nous avons utilisées sont appelées cellules Hana3A. Ce sont des cellules HEK293T qui contiennent de façon stable des protéines accessoires (RTP1, RTP2 et REEP1) et la protéine G_{olf} (Saito et al., 2004). Elles ont été gracieusement fournies par le Dr. H. Matsunami (Duke University Medical Center, Durham, USA). Les cellules Hana3A sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 7,3% de CO₂, et dans un milieu complet composé de MEM (Minimum Essential Medium), de glutaMAX™ I (2 mM), d'acides aminés non essentiels (100 µM), de sérum du veau foetal (SVF ; 10%) inactivé par la chaleur et contenant un antibiotique, la puromycine (1 µg/mL). Pour les études d'imagerie calcique, les cellules sontensemencées à une densité de 3.10^4 cellules par puits dans des plaques noires de 96 puits à fond en verre (BD Biosciences), préalablement traitées par 50 µL de polyéthylèneimine (2,5 µg/mL) afin de faciliter leur adhérence au support.

II.4 Transfection

La transfection des cellules Hana3A par les plasmides est réalisée 24 heures après l'ensemencement dans les plaques 96 puits à l'aide du Fugene HD (Promega) selon les instructions du fournisseur. Le Fugène est une molécule de nature lipophile, qui forme des complexes avec l'ADN plasmidique et l'aide à pénétrer dans les cellules. Les cellules ont été transfectées avec les plasmides contenant l'ADNc du gène codant un récepteur olfactif (OR1A1, OR1G1, OR52D1, OR2W1 ou rI7 ; 50 ng/puits), la protéine $G\alpha 16$ (10 ng/puits) et des protéines accessoires (RTP1S et Myr-Ric-8A ; 10 ng de chaque vecteur/puits). Pour évaluer les réponses non spécifiques, c'est-à-dire des réponses calciques dans des cellules n'exprimant pas de récepteur olfactif, des transfections avec un vecteur vide (pCMV-Tag-Rho, 50 ng/puits) et les plasmides contenant les gènes des protéines accessoires ont été effectuées.

II.5 Imagerie calcique

Environ 24 heures après la transfection, les cellules sont lavées avec une solution saline de tampon Hanks (Invitrogen, Life Technologies) contenant 2 mM CaCl₂ et supplémentée par de l'HEPES (acide sulfonique n-2-hydroxyéthylpipérazine-n-2-éthane) 20 mM (tampon Hanks-HEPES-CaCl₂). Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes à 37°C dans le milieu Hanks-HEPES-CaCl₂ contenant une sonde calcium-dépendante, le Fura-2-acétoxy-méthylester (Fura-2-AM ; 5 μM) (Molecular Probes, Life Technologies) et 0,05% d'acide pluronique qui facilite la solubilisation de composés peu hydrosolubles comme le Fura-2-AM dans les milieux physiologiques. Le Fura2-AM est une sonde ratiométrique qui se lie au Ca²⁺ intracellulaire libre et qui possède un fort rendement quantique. En présence de Ca²⁺, l'émission de fluorescence du Fura2-AM est mesurée à 510 nm en réponse à une excitation à 340 nm et 380 nm. Deux rinçages sont ensuite réalisés afin d'éliminer la sonde en excès. Finalement, les cellules sont reprises dans 50 μL/puits de tampon Hanks-HEPES-CaCl₂. L'application des odorants et les mesures d'imagerie calcique débutent après cette étape.

Les solutions d'odorants, 3 fois plus concentrées que les concentrations finales souhaitées, sont préparées en diluant des aliquotes de solutions mères dans le tampon Hanks-HEPES-CaCl₂. Chaque solution d'odorant (100 μL) est appliquée manuellement à l'aide d'une pipette sur le champ cellulaire sélectionné. La concentration finale de DMSO dans les puits n'excède pas 0.01% (v/v). Chaque mesure a été réalisée en double et les expériences ont été répétées 3 fois. Les mesures sont réalisées dans une pièce climatisée (+28°C).

La capacité des cellules à produire une réponse calcique (contrôle positif) a été évaluée en appliquant une solution d'ATP 100 μM sur les cellules. L'ATP stimule les récepteurs purinergiques intrinsèques couplés à la voie inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) via des protéines G endogènes. L'IP3 active la libération du Ca²⁺ intracellulaire, entraînant de ce fait une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺. Des comptages de cellules répondant à l'ATP sur plusieurs champs cellulaires choisis au hasard ont permis d'estimer que dans nos conditions expérimentales, un champ cellulaire analysé contient en moyenne 800 cellules « fonctionnelles ».

Le microscope utilisé pour effectuer les mesures d'imagerie calcique est un microscope inversé Nikon TiE équipé d'un objectif à fluorescence Plan S Fluor 10X. Il est associé à un système d'illumination, le Sutter DG4 (lampe au xénon) et à une caméra Andor LucaR. Le logiciel NIS-Elements AR (Maibeche-Coisne et al.) est utilisé pour piloter les différents appareils, acquérir et traiter les données. Lors de chaque stimulation par un odorant, une séquence d'images est enregistrée pendant 3 minutes (une image par seconde). La séquence est ensuite observée en accéléré. Les cellules dans lesquelles un signal calcique a été induit sont repérées et comptées.

II.6 Expression des résultats

Le niveau d'activation des RO par les mélanges binaires est représenté de deux manières :

- ***Pourcentage de cellules activées en fonction de la concentration des odorants dans le mélange*** (Chaput et al., 2012; Sanz et al., 2005 ; Sanz et al., 2008).

Le pourcentage de cellules activées dans chaque champ cellulaire analysé est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de cell. activées} = \frac{\text{nombre de cell. fluorescentes} - \text{nombre de cell. « vecteur vide » fluorescentes}}{800} \times 100$$

Pour chaque stimuli, le nombre de cellules fluorescentes observé dans un puits transfecté par un vecteur contenant un gène codant un RO (= nombre de cell. fluorescentes) et le nombre de cellules fluorescentes observé dans un puits transfecté par un vecteur vide (= nombre de cell. «vecteur vide» fluorescentes) sont mesurés en parallèle sur un champ cellulaire de 800 cellules fonctionnelles. La valeur obtenue dans le puits transfecté par le vecteur vide est soustraite du résultat obtenu dans le puits transfecté par le vecteur contenant le gène du RO étudié. Le taux de cellules activées est ensuite exprimé en pourcentage.

- **Représentation synthétique de Patte et Laffort : $\sigma = f(\tau)$**

Cette représentation, introduite par Patte et Laffort en 1979 (Patte and Laffort, 1979), a été utilisée dans plusieurs études psychophysiques menées chez l'Homme pour évaluer efficacement certains aspects clés du comportement de mélanges binaires telle que l'existence d'effets liés à la proportion des constituants du mélange (intensité) (Atanasova et al., 2004; Cain et al., 1995 ; Olsson, 1994 ; Thomas-Danguin and Chastrette, 2002). Dans l'approche psychophysique, cette représentation est basée uniquement sur des réponses perceptives, à savoir les intensités perçues. Cette notion de réponse peut être transposée à des données cellulaires en considérant que les réponses sont les réponses positives des cellules à l'application d'un odorant, à savoir le pourcentage de cellules activées. La réponse au mélange (R_{mix}) est normalisée par rapport à la somme des réponses des deux constituants A et B analysés séparément ($R_A + R_B$). Il s'agit du paramètre sigma : $\sigma = R_{\text{mix}} / (R_A + R_B)$. Le paramètre σ est exprimé en fonction du paramètre Tau (τ) qui correspond au rapport entre la réponse du composé A, ou B, et la somme des réponses des deux constituants A et B ($R_A + R_B$) : $\tau_A = R_A / (R_A + R_B)$ ou $\tau_B = R_B / (R_A + R_B)$. On peut représenter $\sigma = f(\tau_A)$ ou $\sigma = f(\tau_B)$.

La représentation de σ en fonction de τ , [$\sigma = f(\tau)$], illustrée dans la Figure 3, permet de visualiser cinq régions qui présentent les différents effets quantitatifs des mélanges binaires (également appelés interactions) décrits par Cain et Drexler (Cain and Drexler, 1974).

Cinq effets peuvent être distingués:

- Effet d'hyper-addition ou synergie : $\sigma > 1$, c'est-à-dire $R_{\text{mix}} > R_A + R_B$
- Effet d'addition complète : $\sigma = 1$, c'est-à-dire $R_{\text{mix}} = R_A + R_B$
- Effet d'hypo-addition : $\sigma < 1$, c'est-à-dire $R_{\text{mix}} < R_A + R_B$
 - Cet effet peut être subdivisé en trois sous-types :
 - Addition partielle : $\max(\tau_A, \tau_B) < \sigma < 1$, c'est-à-dire $\max(R_A, R_B) < R_{\text{mix}} < R_A + R_B$
 - Compromis : $\min(\tau_A, \tau_B) < \sigma < \max(\tau_A, \tau_B)$, c'est-à-dire $R_B < R_{\text{mix}} < R_A$ ou $R_A < R_{\text{mix}} < R_B$
 - Soustraction : $\sigma < \min(\tau_A, \tau_B)$, c'est-à-dire $R_{\text{mix}} < \min(R_A, R_B)$

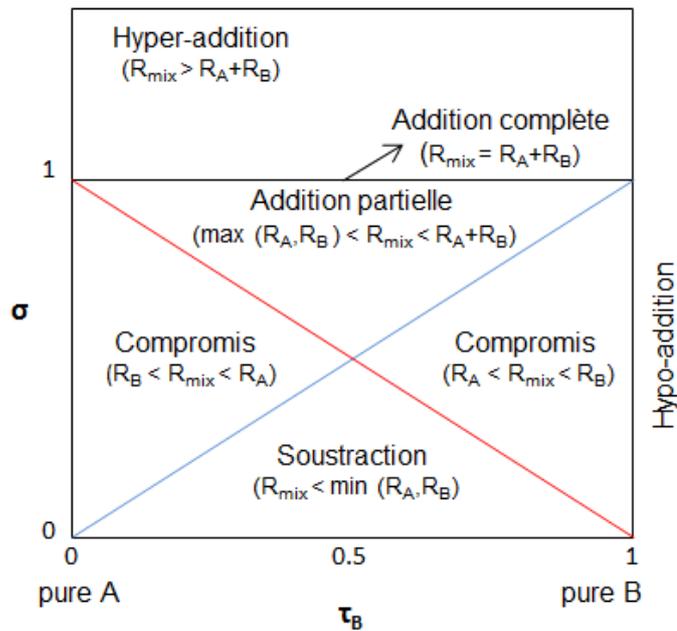


Figure 3 : Principales interactions quantitatives induites par les mélanges binaires.

Les différentes caractéristiques des mélanges binaires sont représentées en utilisant la représentation graphique [$\sigma = f(\tau)$] proposée par Patte et Laffort (1979).

Dans la représentation graphique [$\sigma = f(\tau)$], les lignes délimitant les principales interactions des mélanges correspondent à des effets spécifiques. La ligne rouge correspond à $\sigma = R_A$ (dans ce cas, $R_{mix} = R_A$) et la ligne bleue correspond à $\sigma = R_B$ (dans ce cas, $R_{mix} = R_B$).

III. Résultats

III.1 Activation des récepteurs olfactifs par les odorants appliqués isolément

Les réponses des récepteurs OR1A1, OR1G1, OR52D1, OR2W1 et rI7 activés par l'Oct, le Cit et le Méth appliqués séparément sont présentées dans les Figure 21 Figure 22. Les mesures d'imagerie fonctionnelle montrent que l'activation des cinq RO dépend de la concentration des 3 odorants, ce qui indique que ces odorants sont des agonistes de ces récepteurs. Cependant, tous les récepteurs ne répondent pas de manière identique aux odorants. On peut noter que l'Oct et le Cit activent plus efficacement les RO humains étudiés que le Méth, ce qui suggère que ces récepteurs présentent une plus forte affinité pour l'Oct et le Cit. Le Cit est l'odorant le plus efficace, avec 15 à 30% de cellules activées à la concentration de 1 mM (Figure 21A), cette concentration, l'Oct et le Méth induisent des effets cytotoxiques ; nous n'avons donc pas évalué les effets de ces 2 odorants sur les RO au-delà de 0,5 mM. L'Oct induit une réponse maximale dans les cellules exprimant OR1G1 (environ 18% de cellules activées à 0,3 mM) (Figure 21A). Le Méth, quant à lui, est un faible agoniste : le niveau maximal d'activation des récepteurs par le Méth ne dépasse pas 8% (Figure 21B).

En ce qui concerne l'activation de rI7 par les différentes molécules odorantes, on observe que globalement, le niveau d'activation est plus faible que celui mesuré dans le cas des RO humains (Figure 22). On observe que l'Oct active de manière un peu plus importante le récepteur rI7 que le Cit et le Méth. Le Cit est néanmoins plus efficace que l'Oct à la plus forte concentration testée (0,5 mM). Le niveau d'activation de rI7 par le Méth reste faible sur toute la gamme de concentration examinée.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que l'Oct et Cit sont de meilleurs agonistes que le Méth, quel que soit le RO. Le citronellal peut être considéré comme un fort agoniste pour les récepteurs humains OR1G1 et OR2W1.

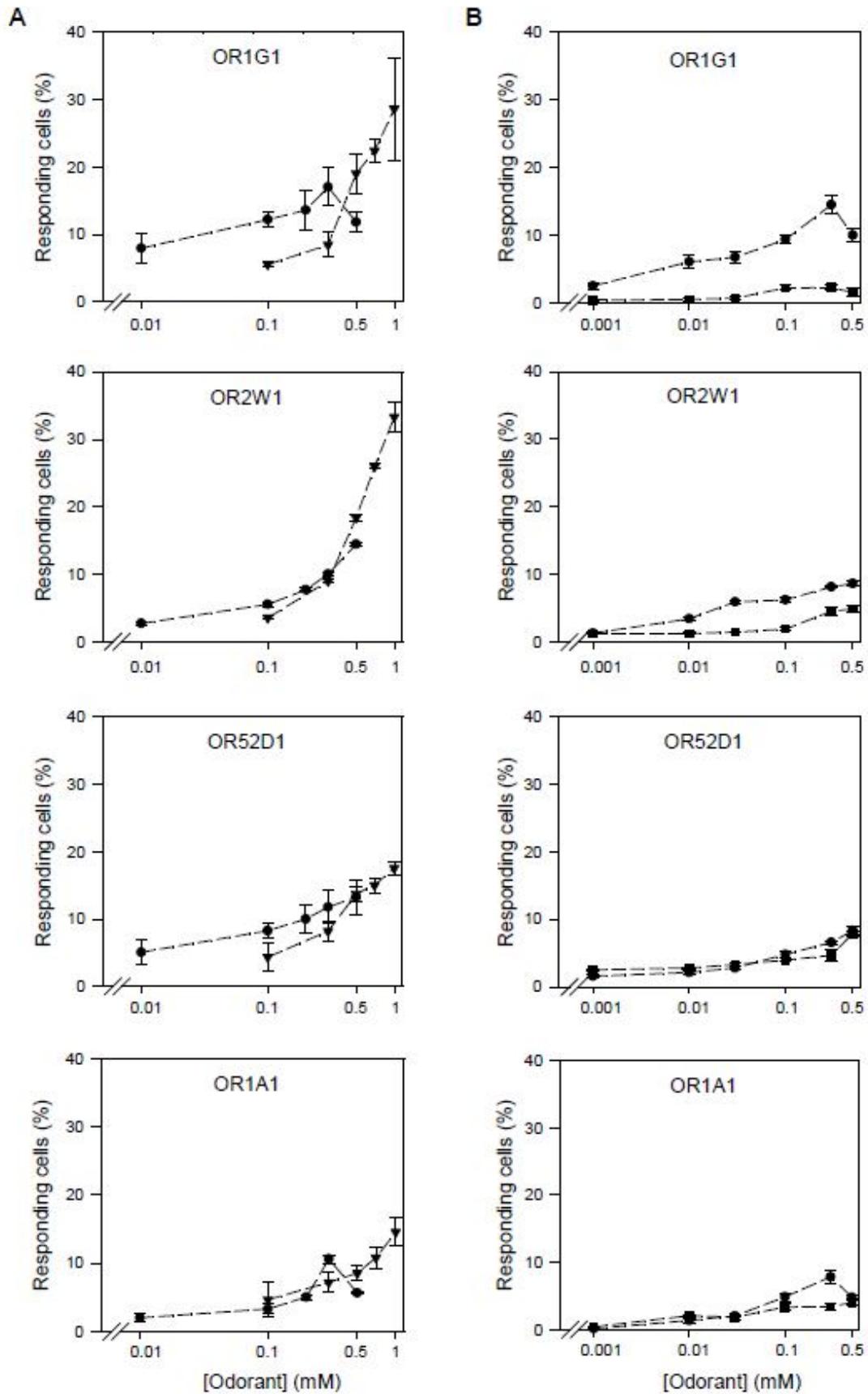


Figure 4 : Activation des cellules Hana3A exprimant les récepteurs olfactifs humains OR1G1, OR2W1, OR52D1 ou OR1A1 par les odorants appliqués isolément.

A : Réponses des cellules stimulées par l'octanal (●) ou le citronellal (▼); **B :** réponses des cellules stimulées par l'octanal (●) ou le méthional (■). Les propriétés des deux couples d'odorants ont été évaluées dans 2 études indépendantes. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm erreur type de la moyenne (ES, n = 3 répétitions).

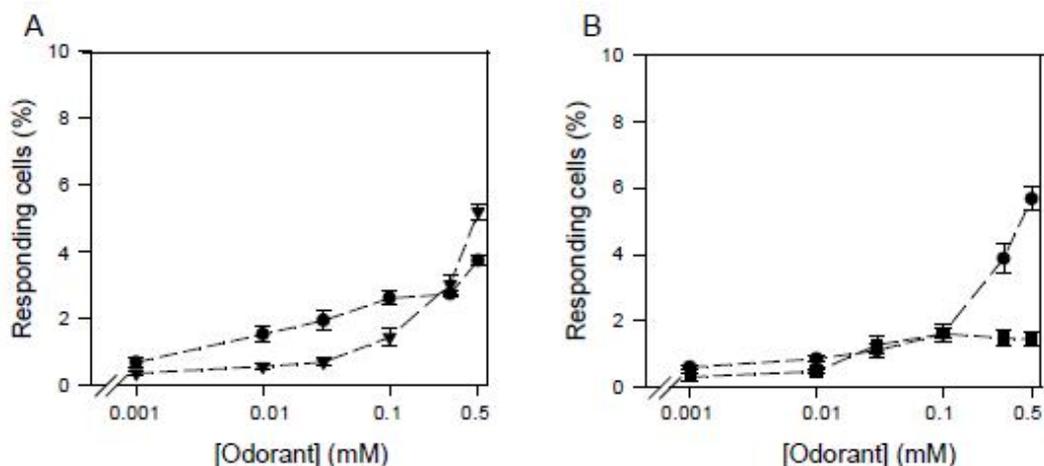


Figure 5 : Activation des cellules Hana3A exprimant le récepteur olfactif de rat rI7 par les odorants appliqués isolément.

A : Réponses des cellules stimulées par l'octanal (●) ou le citronellal (▼); **B :** réponses des cellules stimulées par l'octanal (●) ou le méthional (■). Les propriétés des deux couples d'odorants ont été évaluées dans 2 études indépendantes. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne \pm ES (n = 3 répétitions).

III.2 Activation des récepteurs olfactifs par les mélanges

Les récepteurs OR1A1, OR1G1, OR52D1, OR2W1 et rI7 étant activés par l'Oct, le Cit et le Méth, les effets des deux mélanges binaires Oct + Cit et Oct +Méth sur l'activation de ces cinq récepteurs ont été évalués.

Les mélanges ont été préparés comme suit: chaque point de la gamme de concentration d'Oct a été mélangé à chaque point de la gamme de Cit ou de Méth. Au total, pour chaque récepteur, 25 combinaisons pour le mélange Oct + Cit et 36 combinaisons pour le mélange Oct + Méth ont été appliquées et les résultats comparés aux réponses induites par les différentes concentrations des odorants hors mélange. Les résultats obtenus sont présentés dans les Figure 23, Figure 24 et Figure25.

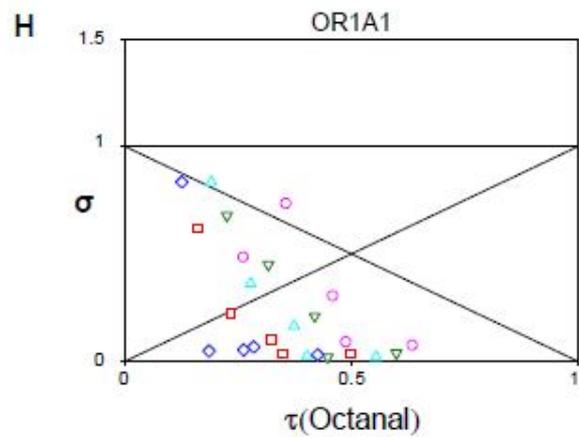
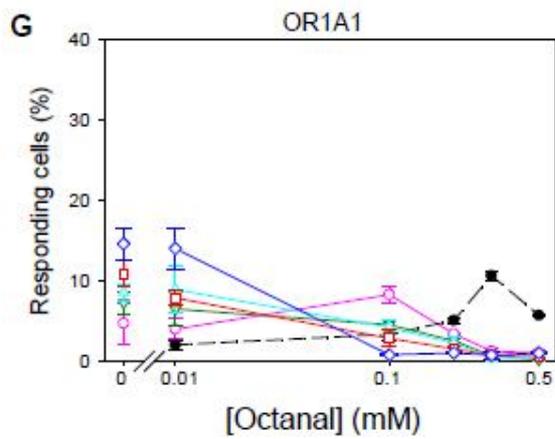
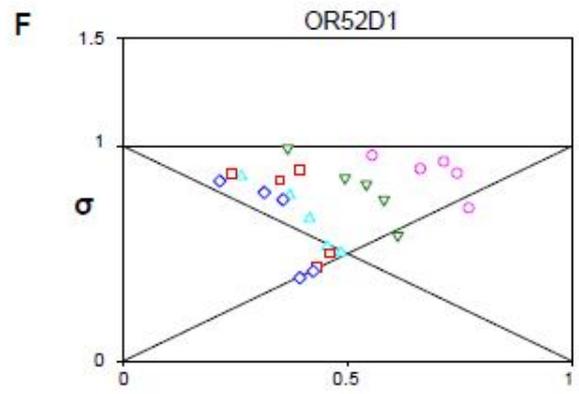
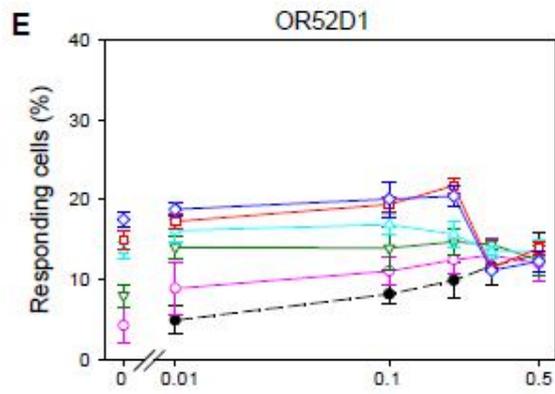
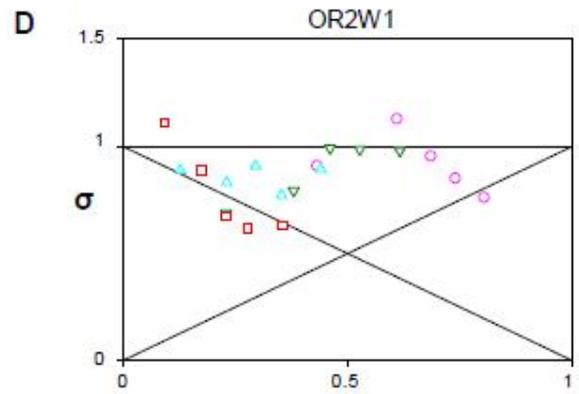
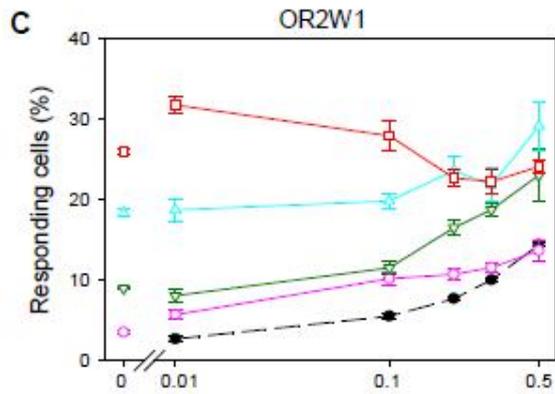
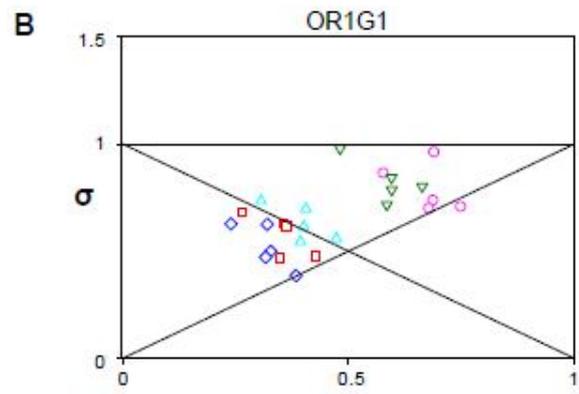
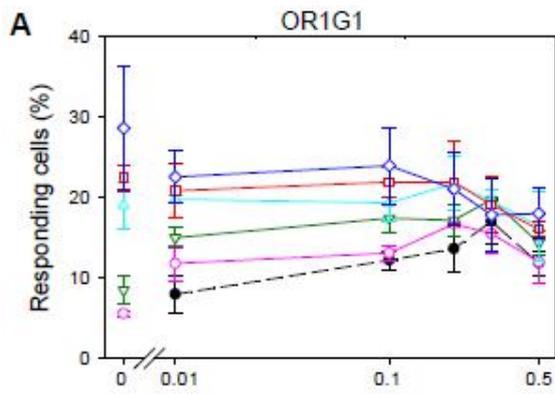


Figure 6 : Activation des cellules Hana3A exprimant les récepteurs humains OR1G1, OR2W1, OR52D1 ou OR1A1 par le mélange binaire octanal + citronellal (Oct + Cit). Les cellules ont été stimulées par les molécules appliquées isolément (gamme de concentrations croissantes) et par les mélanges (25 combinaisons différentes). Les graphes **A**, **C**, **E**, **G** représentent les réponses des récepteurs exprimées en pourcentage de cellules activées en fonction de la concentration des odorants. Les données sont présentées comme suit : (●) Oct seul, (○) Oct + 0,1 mM Cit, (▽) Oct + 0,3 mM Cit, (△) Oct + 0,5 mM Cit, (□) Oct + 0,7 mM Cit, (◇) Oct + 1 mM Cit. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répétitions \pm ES. Les graphes **B**, **D**, **F**, **H** représentent les réponses des récepteurs selon la représentation $[\sigma = f(\tau_{\text{oct}})]$. Chaque point représente la valeur de σ pour une proportion d'octanal (τ) dans le mélange. Les sigles utilisés pour présenter les données sont identiques à ceux utilisés dans les graphes A, C, E, G.

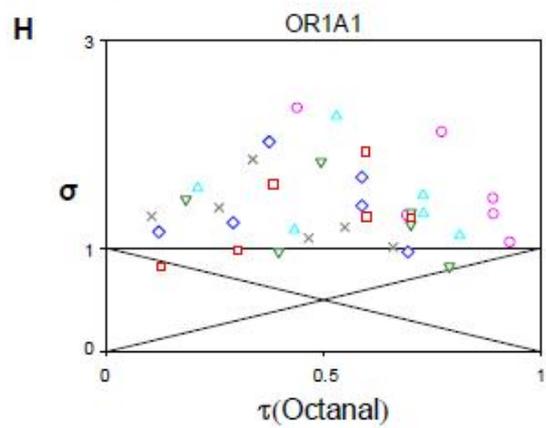
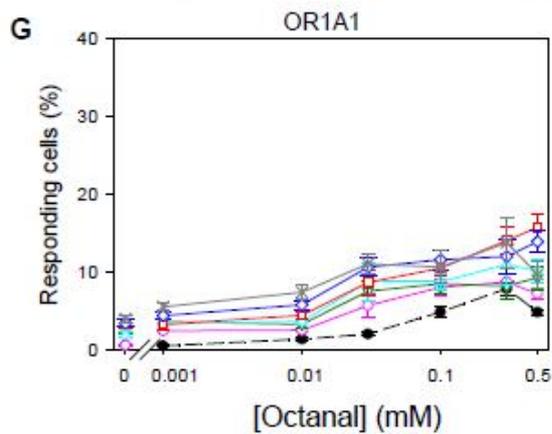
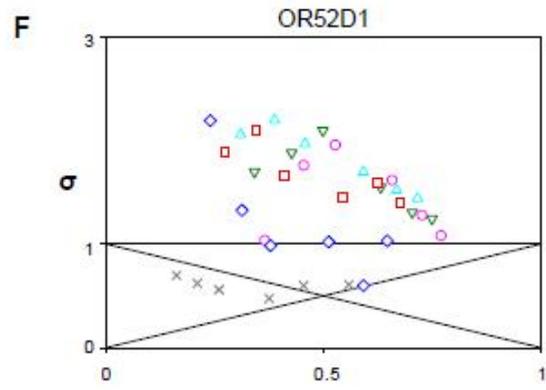
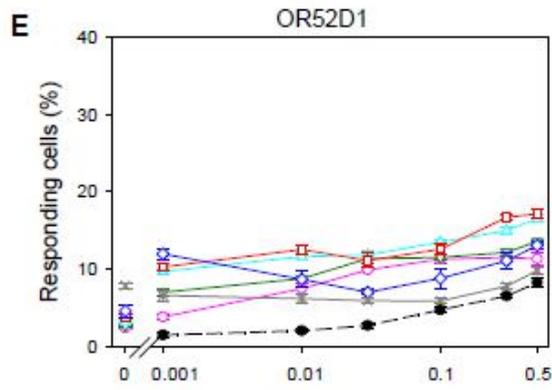
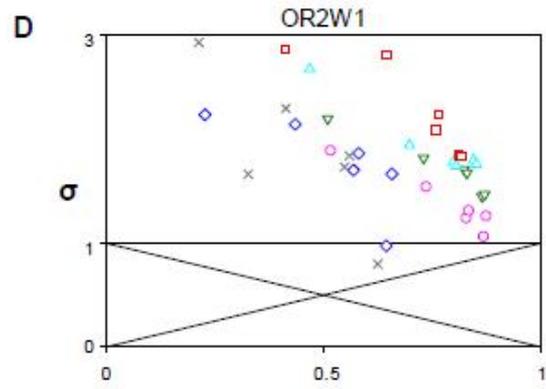
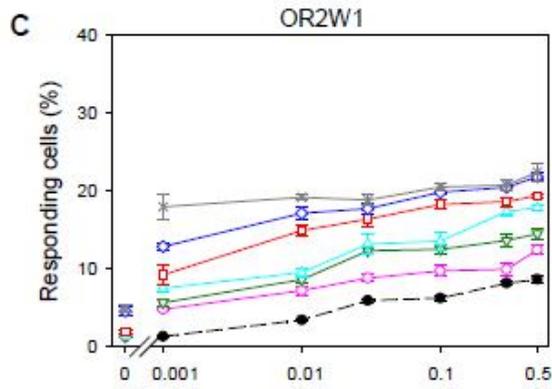
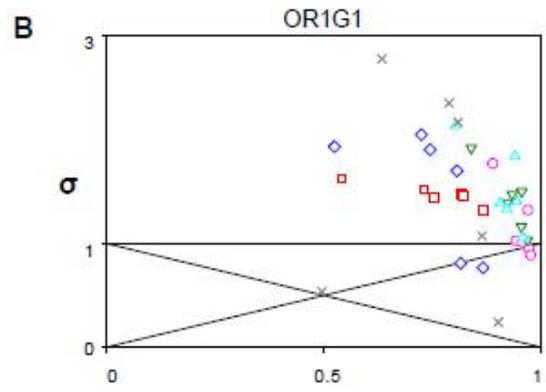
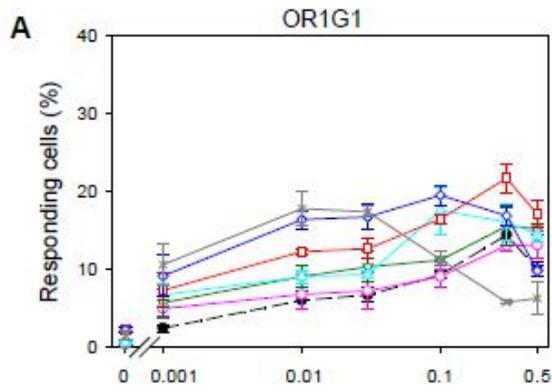


Figure 7 : Activation des cellules Hana3A exprimant les récepteurs humains OR1G1, OR2W1, OR52D1 ou OR1A1 par le mélange binaire octanal + méthional (Oct + Méth). Les cellules ont été stimulées par les molécules appliquées isolément (gamme de concentrations croissantes) et par le mélange (36 combinaisons différentes). Les graphes **A, C, E, G** représentent les réponses des récepteurs exprimées en pourcentage de cellules activées en fonction de la concentration des odorants. Les données sont présentées comme suit : (●) Oct seul, (○) Oct + 0,001 mM Méth, (▽) Oct + 0,01 mM Méth, (Δ) Oct + 0,03 mM Méth, (□) Oct + 0,1 mM Méth, (◇) Oct + 0.3 mM Méth, (×) Oct + 0.5 mM Méth. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répétitions \pm ES. Les graphes **B, D, F, H** représentent les réponses des récepteurs selon la représentation [$\sigma = f(\tau_{oct})$]. Chaque point représente la valeur de σ pour une proportion d'octanal (τ) dans le mélange. Les sigles utilisés pour présenter les données sont identiques à ceux utilisés dans les graphes A, C, E, G.

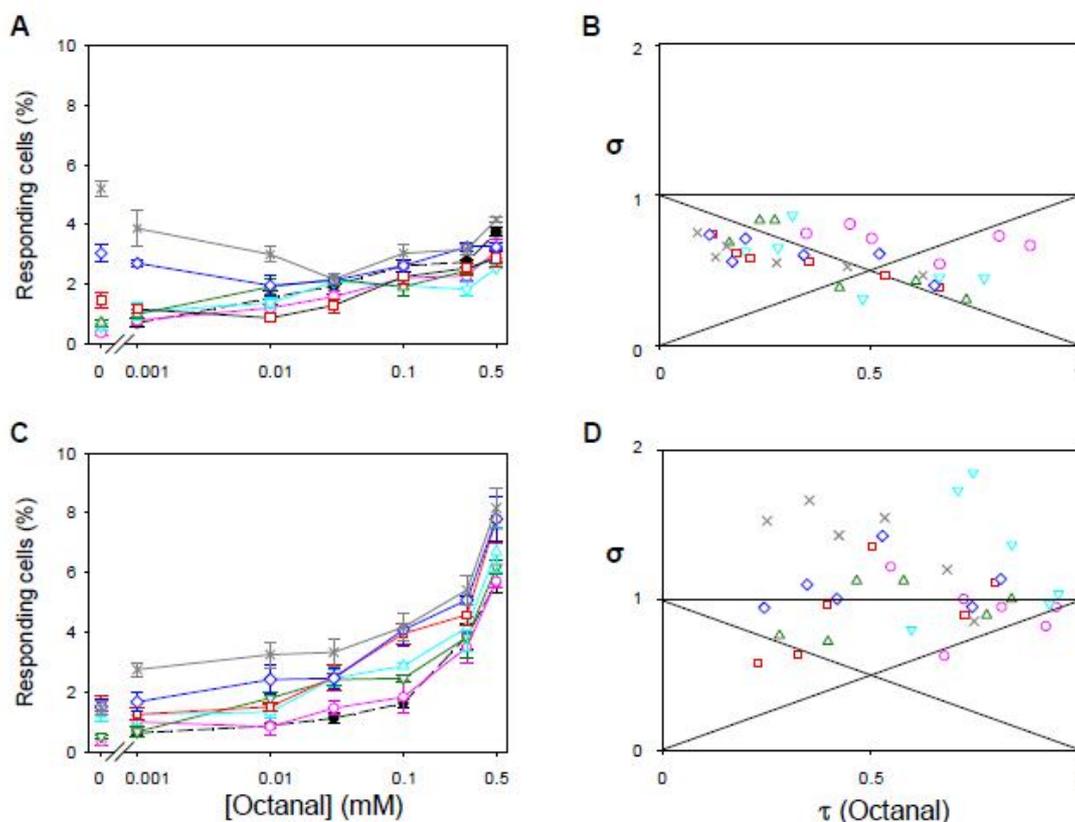


Figure 8 : Activation des cellules Hana3A exprimant le récepteur humain rI7 par les mélanges binaires octanal + citronellal (Oct + Cit) (graphes A et B), et octanal + méthional (Oct + Méth) (graphes C et D). Les cellules ont été stimulées par les molécules appliquées isolément (gamme de concentrations croissantes) et par le mélange (36 combinaisons différentes). Les graphes A, C représentent les réponses des récepteurs exprimées en pourcentage de cellules activées en fonction de la concentration des odorants. Les données sont présentées comme suit : (●) Oct seul, (○) Oct + 0,001 mM Méth ou Cit, (▽) Oct + 0,01 mM Méth ou Cit, (Δ) Oct + 0,03 mM Méth ou Cit, (□) Oct + 0,1 mM Méth ou Cit, (◇) Oct + 0.3 mM Méth ou Cit, (×) Oct + 0.5 mM Méth ou Cit. Les valeurs correspondent à la moyenne de 3 répétitions \pm ES. Les graphes B, D, représentent les réponses des récepteurs selon la représentation [$\sigma = f(\tau_{oct})$]. Chaque point représente la valeur de σ pour une proportion d'octanal (τ) dans le mélange. Les sigles utilisés pour présenter les données sont identiques à ceux utilisés dans les graphes A, C.

Lorsque les RO humains OR1A1, OR1G1, OR52D1 et OR2W1 sont mis en présence d'un mélange d'odorants constitué d'Oct et de Cit, un effet d'hypo-addition est généralement observé (Figure 23). On peut distinguer différents sous-types d'hypo-addition selon le RO et les concentrations des constituants dans les mélanges. Lorsque le mélange contient une faible concentration d'Oct (0,01 mM) et des concentrations de Cit inférieures à 0,3 mM, la réponse des cellules exprimant le récepteur OR1G1 est supérieure à celle induites par les odorants pris séparément (Figure 23A). Par contre, lorsque les concentrations de Cit sont supérieures à 0,3 mM, le mélange induit une réponse intermédiaire entre celles des odorants seuls. A l'aide de la représentation synthétique [$\sigma = f(\tau)$], on visualise plus facilement les réponses des RO au mélange. On observe clairement que le mélange Oct + Cit induit deux types d'interactions, le compromis et l'addition partielle, dans 52% et 48% des cas, respectivement (Figure 23B). Lorsque $\tau < 0,5$, c'est-à-dire lorsque le récepteur devrait être majoritairement activé par le Cit, les réponses du mélange se trouvent dans la zone qui correspond à un effet de compromis. Dans ce cas, le mélange induit des réponses intermédiaires entre celles induites par les composants seuls. Lorsque $\tau > 0,5$, c'est-à-dire lorsque le récepteur devrait être majoritairement activé par l'Oct, les réponses du mélange se trouvent dans la zone d'addition partielle : le mélange induit une réponse supérieure à celle de ses constituants.

Dans le cas des cellules exprimant OR2W1 et OR52D1 (Figure 23C à Figure 23E), le mélange Oct + Cit induit des phénomènes similaires: quelles que soient les concentrations des odorants dans les mélanges, on observe que les réponses de ces deux récepteurs à ce mélange sont, dans la plupart des cas, supérieures aux réponses induites par les molécules odorantes appliquées isolément. Cela correspond à un phénomène d'addition partielle. Dans les cellules transfectées avec OR2W1 (Figure 23D), quelques effets d'hyper-addition ($\sigma > 1$), d'addition complète ($\sigma = 1$) et de compromis ($\min(\tau_{oct}, \tau_{cit}) < \sigma < \max(\tau_{oct}, \tau_{cit})$) sont également observés. Le mélange Oct + Cit provoque aussi des effets de compromis dans les cellules exprimant OR52D1 (Figure 23F). On observe également des réponses indiquant que l'effet du mélange n'est pas différent de l'effet produit par l'Oct lorsque $\tau < 0,5$, c'est-à-dire lorsque les réponses de ce dernier sont moins importantes que celles du Cit (points sur la transversale). Les cellules exprimant OR1A1 présentent un profil de réponse différent. Comme le montrent les Figure 23G et Figure 23H, le mélange Oct + Cit induit des effets de compromis dans 36% des cas et de soustraction dans 64% des cas. Les effets de compromis sont obtenus principalement pour des faibles concentrations d'Oct qui correspondent à des concentrations

où l'Oct est l'odorant le moins efficace hors mélange comparativement au Cit ($\tau_{\text{oct}} < 0,5$). Lorsque la concentration augmente et que l'Oct devient plus efficace vis-à-vis du RO ($\tau_{\text{oct}} > 0,5$), la réponse d'OR1A1 au mélange est nettement inférieure aux réponses du récepteur aux molécules odorantes appliquées isolément (phénomène de soustraction). On observe une quasi-extinction de la réponse du récepteur OR1A1 pour les fortes concentrations d'Oct dans le mélange (Figure 23G).

Lorsque l'Oct est en mélange avec le Méth, le profil de réponse des RO humains est différent de celui observé lorsque l'Oct est en mélange avec le Cit (Figure 24). Bien que le Méth soit un faible agoniste pour les RO étudiés (Figure 21B), la réponse des récepteurs au mélange Oct + Méth est majoritairement supérieure à celles des odorants appliqués isolément. La représentation $[\sigma = f(\tau)]$ montre qu'il s'agit d'un effet d'hyper-addition dans plus de 78% des cas pour les 4 RO humains ; la réponse des récepteurs au mélange est supérieure à la somme des réponses aux odorants seuls. Pour certains ratios, le mélange Oct + Méth induit également des effets de compromis et d'addition partielle. Par contre aucun effet de soustraction n'est observé.

Lorsque les cellules Hana3A expriment le récepteur de rat rI7 (Figure 25), on observe que les deux mélanges se comportent de manière similaire à celle observée pour les RO humains. Le mélange Oct + Cit induit des effets d'hypo-addition (Figure 25B). En effet, la réponse de rI7 à ce mélange est dans 72% des cas intermédiaire entre les réponses constatées pour les odorants seuls (compromis) et cela quelle que soit la valeur de τ_{oct} . Lorsque le récepteur devrait être majoritairement activé par le Cit ($\tau_{\text{oct}} < 0,5$), la réponse de rI7 au mélange est majoritairement plus faible que la réponse à cette même molécule hors mélange. De même, lorsque le récepteur devrait être majoritairement activé par l'Oct ($\tau_{\text{oct}} > 0,5$), la réponse de rI7 au mélange est plus faible que la réponse à l'Oct hors mélange. Dans certains cas, qui correspondent à des mélanges contenant plutôt de faibles concentrations d'Oct et de Cit, le mélange induit des effets d'addition partielle (effet du mélange supérieur à celui de la molécule la plus efficace). Quelques cas de soustraction sont aussi observés.

En ce qui concerne le mélange Oct + Méth, quelles que soient les concentrations des 2 composés, la réponse des cellules exprimant le récepteur rI7 au mélange est quasiment toujours supérieure à celles de ce récepteur aux odorants seuls (Figure 25D). Un effet d'hyper-addition est même observé dans ~50% des cas.

IV. Discussion

Les travaux relatés dans ce chapitre soulignent que les constituants d'un mélange ne sont pas indépendants l'un de l'autre lorsqu'ils sont traités par le système olfactif ; ils génèrent des réponses différentes lorsqu'ils sont présentés séparément ou en mélange. Différents effets sont observés lorsque les cellules Hana3A exprimant des RO sont activées par les deux mélanges binaires d'aldéhyde. Quand l'Oct est mélangé avec le Cit, le mélange induit différents sous-types d'effets d'hypo-addition (addition partielle, compromis et soustraction) en fonction des concentrations et des proportions des composés dans le mélange. Par contre, lorsque l'Oct est en mélange avec le Méth, le mélange induit majoritairement un effet d'hyper-addition quelles que soient les concentrations et les proportions des composées dans le mélange. L'interprétation de cette diversité de réponse est facilitée par la représentation $[\sigma = f(\tau)]$ qui est très utile pour comparer rapidement les grands types et la variété des interactions générés par le mélange avec les réponses des RO aux constituants appliqués seuls. Dans cette représentation, la réponse totale du mélange est normalisée par la somme des réponses des composants pris individuellement. Cette représentation a l'avantage de pouvoir être utilisée pour représenter les résultats issus de différentes techniques (études psychophysique, électrophysiologique...) et donc de comparer facilement les résultats à différents niveaux d'intégration au sein du système olfactif.

Les interactions périphériques pourraient résulter de divers mécanismes.

La variété des effets induits par les deux mélanges d'aldéhyde au niveau des RO étudiés suggère que des mécanismes biologiques complexes sont mis en jeu pour l'encodage du signal olfactif au niveau périphérique. Les différents sous-types d'hypo-addition provoqués par le mélange Oct + Cit pourraient résulter de divers mécanismes de compétition entre les constituants du mélange au niveau du site de liaison des RO. Des effets d'addition partielle ont été observés quand OR2W1 et OR52D1 sont stimulés par ce mélange. Ces deux récepteurs sont activés de manière similaire par l'Oct, mais répondent différemment au Cit. En ce qui concerne OR2W1, qui est fortement activé par le Cit, à faible concentration d'Oct dans le mélange, la réponse de ce récepteur est proche de la réponse du composant le plus fort, c'est-à-dire le Cit. En ce qui concerne OR52D1, qui est activé de façon similaire par

l'Oct et le Cit, la réponse au mélange suit la réponse du Cit à faible taux d'Oct. A l'inverse, aux concentrations où l'Oct active plus fortement le RO comparativement au Cit, la réponse au mélange suit plutôt la réponse de l'Oct. Il semble que la réponse de ces RO à ce mélange dépende de la plus forte composante dans le mélange (composante la plus efficace pour l'activation), c'est-à-dire soit de la composante la plus concentrée soit de la composante qui présente la plus forte affinité pour le RO. Ceci suggère donc que la compétition entre les deux molécules vis-à-vis du RO serait plutôt faible.

L'effet d'hypo-addition est plus prononcé lorsqu'OR1G1 est stimulé par le mélange Oct + Cit. La réponse de ce récepteur au mélange semble fortement influencée par l'Oct. Aux faibles proportions d'Oct, un effet de compromis a été mis en évidence. Dans ce cas, la réponse du récepteur au mélange est inférieure à celle provoquée par le Cit seul, malgré le fait que ce dernier soit un fort ligand. Il est ainsi probable que ces deux molécules rentrent en compétition pour le site de liaison du RO. Ainsi on peut penser que la loi d'action de masse va faire que tantôt Oct tantôt Cit se liera au RO, mais qu'en moyenne l'odorant de plus grande affinité se liera plus souvent que l'autre (Rospars et al., 2008).

En ce qui concerne le récepteur OR1A1, les résultats ont montré que l'Oct est un ligand plus faible que le Cit. Cependant, plus la proportion d'Oct dans le mélange augmente, plus la réponse d'OR1A1 diminue jusqu'à extinction du signal. Cet effet de soustraction traduit une forte interaction entre les deux constituants du mélange au niveau du récepteur. L'agoniste le plus faible (l'Oct) pourrait se lier à proximité du site de liaison de l'agoniste le plus fort, empêchant de ce fait le changement de conformation nécessaire à la transduction du signal. Des effets similaires ont été observés avec des mélanges binaires contenant un constituant inactif ou faiblement actif. Par exemple, Spehr et collaborateurs ont montré que l'activation du récepteur humain OR17-4 par le bourgeonal est totalement inhibée par l'undécanal, une molécule n'ayant aucun effet activateur sur ce récepteur (Spehr et al., 2003). Cet effet antagoniste se traduit au niveau perceptif par une suppression de l'odeur du bourgeonal par l'undécanal chez des sujets humains stimulés par les 2 molécules simultanément (Spehr et al., 2004). Ce phénomène a également été observé dans le cas du mélange eugénol/méthylisoeugénol au niveau du récepteur de souris MOR-EG (Oka et al., 2004a).

Lorsque l'Oct est en mélange avec le Méth, les profils de réponse sont différents de ceux observés pour le mélange Oct + Cit. Un effet d'hyper-addition est observé dans plus de 70% des cas, quel que soit le RO et quelle que soit la proportion des constituants dans le mélange. Quelques cas d'hypo-addition ont également été observés pour OR52D1 aux plus fortes concentrations de Méth dans le mélange. L'hyper-addition, et dans une certaine mesure les effets d'addition partielle, pourraient résulter de mécanismes non-compétitifs. Dans cette situation, les deux molécules agissent en coopération positive. Ce type de phénomène pourrait conduire à un changement dans la conformation du récepteur (transition allostérique) qui peut modifier l'affinité du récepteur pour le substrat ou l'efficacité de la réponse. Ces mécanismes peuvent aussi être expliqués par l'existence de sites de liaison multiples dans la poche de liaison orthostérique du récepteur ou par la liaison d'un des composés sur un site allostérique. Autrement dit, certains RO pourraient avoir un ou plusieurs sites secondaires. Plusieurs travaux menés au cours de ces 15 dernières années ont révélé que la famille A des RCPG est très sensible à la modulation allostérique. Des études ont mis en évidence la présence de sites allostériques au niveau de la 2^{ème} et 3^{ème} boucle extracellulaire ainsi qu'au sommet du domaine transmembranaire 7 (Jensen and Spalding, 2004). Il a également été montré que des molécules agissant comme des modulateurs allostériques peuvent se lier à l'intérieur de l'hélice transmembranaire de RCPG appartenant à la famille A (Goblyos and Ijzerman, 2011 ; Heitman et al., 2012).

En ce qui concerne l'activation du rI7 par les deux mélanges d'aldéhydes, des effets similaires à ceux observés au niveau des RO humains ont été mis en évidence. Le mélange Oct + Cit induit principalement des effets de compromis mais également des effets d'addition partielle. Par rapport aux RO humains, le récepteur rI7 présente néanmoins une particularité: les effets de compromis provoqués par ce mélange sont observés aussi bien quand l'un ou l'autre des constituants du mélange est présent en plus faible concentration (c'est-à-dire quelle que soit la valeur de τ). La réponse de ce récepteur au mélange semble donc fortement influencée par les 2 composés en présence, quelle que soit leur concentration. Ceci suggère une forte compétition entre l'Oct et le Cit au niveau du site de liaison de rI7. Cela est tout à fait possible car nous avons observé que ces 2 molécules activent de manière similaire le récepteur rI7, l'Oct étant un peu plus efficace. Cette observation est tout à fait en accord avec les résultats d'une étude qui avait comparé le niveau d'activation de NSO de rat exprimant le récepteur rI7 par une série d'aldéhydes (Araneda et al., 2000). Dans une étude ultérieure, la

même équipe a montré que plusieurs aldéhydes, notamment des molécules cycliques ayant peu ou pas d'activité agoniste, peuvent bloquer l'activation de ce récepteur par l'Oct (Peterlin et al., 2008). Le citronellal n'a pas été testé dans cette étude. Les auteurs suggèrent que des aldéhydes ayant une conformation proche de l'Oct peuvent bloquer l'activation de rI7, même s'ils n'ont pas d'activité agoniste.

Lorsque l'Oct est en mélange avec le Méth, il semble, comme dans le cas des RO humains, que les deux molécules coopèrent positivement au niveau du récepteur rI7. Quelles que soient les concentrations, la réponse de ce récepteur au mélange est majoritairement supérieure à celles des composants appliqués isolément.

Bases moléculaires de la modulation de l'activité des RO par des mélanges odorants.

En combinant des approches de modélisation moléculaire avec la mutagenèse dirigée, quelques groupes de recherche ont réussi à identifier les positions des sites de liaison impliqués dans l'activation de certains RO humains (Gelis et al., 2012 ; Launay et al., 2012; Schmiedeberg et al., 2007). Il a été montré que la liaison de composés odorants au récepteur OR1G1 est dominée par des liaisons hydrophobes (Charlier et al., 2012) qui permettrait la liaison de plusieurs types de molécules. Toutefois, les agonistes d'OR1G1 se lieraient de manière différente en fonction des groupes fonctionnels. En ce qui concerne les aldéhydes tels que l'Oct, le groupement carbonyle formerait une interaction électrostatique forte avec un acide aminé spécifique (Lys80) (Launay et al., 2012). Un certain nombre d'acides aminés essentiels situés dans les domaines transmembranaires TM2 et TM7 a également été identifié dans le récepteur OR1A1 et l'implication de certains d'entre eux dans liaison du Cit a été démontrée expérimentalement (Schmiedeberg et al., 2007 ; Stary et al., 2007). Plus généralement, il a été proposé que les ligands se lient à différentes profondeurs dans la poche de liaison des RCPG, dont certains très profondément et d'autres plus superficiellement (Nygaard et al., 2009). Ces études suggèrent donc que les substances odorantes peuvent se lier en différents endroits dans la poche de liaison des RO, ce qui offre de multiples possibilités d'interactions.

Par ailleurs, il est aujourd'hui largement admis que la dimérisation des RCPG joue un rôle important à différents stades du cycle de vie de ces récepteurs, notamment l'activation et

la transduction du signal (Terrillon and Bouvier, 2004). Dans une étude récente, Wade et collaborateurs (2011) ont mis en évidence l'homo-dimérisation du récepteur humain OR17-40 et ont démontré que la liaison d'un ligand entraîne des changements de conformation du dimère (Wade et al., 2011). Chaque protomère porterait un site potentiel de liaison. L'activité du dimère pourrait dépendre du taux d'occupation de ces sites. A faible concentration, la liaison d'un ligand sur un des protomères induirait une conformation active du récepteur et donc une réponse fonctionnelle. Par contre, une concentration élevée de ligand provoquerait l'occupation des deux sites du dimère, ce qui provoquerait des changements de conformation et favoriserait une forme inactive et l'absence de réponse fonctionnelle (Vidic et al., 2008 ; Wade et al., 2011). Selon le taux d'occupation des sites de liaison, les différentes conformations permettraient, ou non, l'accessibilité de la protéine G au récepteur, sa liaison aux acides aminés potentiellement impliqués dans cette interaction et l'initiation de la transduction du signal. La dimérisation des RCPG peut donc affecter la pharmacologie des récepteurs de manière similaire à celles des modulateurs allostériques en provoquant une augmentation ou une diminution de la réponse aux substances odorantes. Ce phénomène a été largement démontré pour la famille C des RCPG et s'appliquerait également à la famille A des RCPG tels que le récepteur de la dopamine D2 ou le récepteur de l'angiotensine (Pin et al., 2003 ; Szalai et al., 2012). L'impact de la dimérisation sur la réponse des RO à des mélanges d'odorants mériterait d'être exploré.

Les interactions périphériques peuvent contribuer au codage de mélange odorant.

Dans cette étude, nous avons observé différents types d'interaction lorsque les RO sont activés par les mélanges Oct + Cit et Oct + Méth. De plus, même si un petit nombre de RO ont été testés, nos résultats indiquent que le type d'interaction est davantage lié à la nature du mélange qu'au récepteur. Ces observations sont particulièrement intéressantes car elles suggèrent un encodage des mélanges au niveau périphérique, en amont des processus d'intégration du signal olfactif qui ont lieu au niveau central. En effet, les phénomènes que nous avons observés au niveau des RO rappellent fortement ceux mis en évidence dans des études physiologiques et psychophysiques. Ainsi, plusieurs études effectuées sur les effets quantitatifs de mélanges binaires ont souligné que l'effet d'addition partielle et l'effet de compromis sont des phénomènes assez systématiques dans le cas des mélanges binaires ; par

contre, l'effet d'hyper-addition est rarement observé (Duchamp-Viret et al., 2003; Ferreira, 2012). Ensemble, ces études suggèrent que les interactions périphériques contribuent de manière significative à l'élaboration des caractéristiques perceptives des mélanges d'odorants.

Des études antérieures sur la perception de mélanges d'aldéhydes ont montré que le mélange Oct + Cit produit des effets de masquage chez l'Homme et le rat (Burseg and de Jong, 2007 ; Kay et al., 2003) ainsi qu'une perception synthétique chez le rat dans certaines conditions (Kay et al., 2005; Kay et al., 2003). Plus précisément, la perception du Cit par les sujets humains est significativement altérée lorsque ce composé est mélangé avec des concentrations croissantes d'Oct. Chez le rat, il a été montré que ni la qualité d'Oct ni celle du Cit ne sont reconnues à certains ratios (Cit-Oct 5:1 et 1:1), c'est-à-dire que les animaux semblent percevoir une nouvelle odeur, différente de celles de l'Oct et du Cit, ou bien aucune odeur (Kay et al., 2005; Kay et al., 2003). Kay et collaborateurs ont suggéré que les propriétés synthétiques d'un mélange résulteraient du chevauchement des composés agonistes au niveau des sites de liaison des RO (Kay et al., 2003). On peut également faire l'hypothèse que ces deux substances odorantes peuvent, à certains niveaux de concentration, activer un grand nombre de RO et induire ainsi une perte de l'identité de chaque composé en favorisant un processus synthétique. La perception synthétique d'un mélange chez les mammifères pourrait être associée à une combinaison spécifique d'odorants et à certaines proportions de ces composants dans le mélange (Sinding et al., 2011).

Bien qu'il ne soit pas aisé de corrélérer les propriétés qualitatives mises en évidence dans les études psychophysiques avec les effets quantitatifs que nous avons observés au niveau des RO, on peut suggérer que les effets d'hypo-addition, qui atteignent dans plusieurs cas des effets de compromis et de soustraction, sont compatibles avec des effets de masquage également observés au niveau comportemental. En effet, pour quatre récepteurs (OR1G1, OR52D1, OR1A1 et rI7), les concentrations élevées d'Oct dans les mélanges Oct + Cit sont associées à une diminution de la réponse du récepteur qui peut aller jusqu'à une inhibition totale de la réponse dans le cas d'OR1A1. Ces résultats indiquent que la réponse des récepteurs aux mélanges est probablement guidée par la composante la plus concentrée. Les effets de compromis observés dans le cas de rI7 sont particulièrement intéressants car ils sont clairement en adéquation avec les effets de masquage observés chez le rat lorsque le mélange contient une forte concentration de l'un des 2 constituants (Kay et al., 2005; Kay et al., 2003).

Pour le mélange Oct + Méth, nos résultats ont montré une hyper-addition systématique, alors qu'un effet de masquage a été décrit au niveau perceptif chez l'Homme (Burseg and de Jong, 2009). Notre étude sur les interactions générées par les mélanges au niveau des RO n'a porté que sur seulement quatre RO humains et un récepteur de rat. Étant donné que la famille des gènes codant des RO humains comprend environ 400 gènes (Matsui et al., 2010), nos résultats ne sont certainement pas représentatifs de l'ensemble des RO activés par ces deux substances odorantes. En effet, on sait qu'une molécule odorante peut activer plusieurs RO (Malnic et al., 1999), et que ce nombre peut varier en fonction de la concentration (Araneda et al., 2004 ; Fried et al., 2002). Chez le rat, l'Oct (à une concentration de 30 μ M) activerait environ 6% des RO fonctionnels (Araneda et al., 2004 ; Peterlin et al., 2008). Si on extrapole ce pourcentage au génome humain, cela signifie qu'environ 24 RO humains pourraient répondre à l'Oct. Il a également été relevé que les RO de rats activés par l'Oct présentent différents profils pharmacologiques. Certains récepteurs peuvent être activés par plusieurs aldéhydes tandis que d'autres sont stimulés par un nombre restreint de composés (Araneda et al., 2004). Ainsi, tous les RO sensibles à l'Oct ne répondent probablement pas aux mélanges binaires de la même façon. C'est donc la combinaison de tous les RO, activés à des degrés divers par le mélange, qui confèrera au mélange ses caractéristiques qualitatives et quantitatives.

Les résultats issus de ce travail témoignent que de multiples interactions, similaires à celles observées au niveau perceptif, peuvent avoir lieu lorsqu'un mélange binaire d'odorant se retrouve au niveau des RO. Les études psychophysiques ont en effet démontré que, très souvent, l'intensité perçue d'un mélange odorant ne correspond pas à la somme de l'intensité de ses composants perçue hors mélange. Nos observations confortent l'hypothèse selon laquelle les caractéristiques perceptives des mélanges résultent de mécanismes qui ont lieu dès la périphérie du système olfactif. Nous avons mis en évidence que dans certains cas, de faibles variations de la concentration des substances odorantes en mélange peuvent produire des interactions différentes tandis que dans d'autres cas (par exemple lorsque OR2W1 et r17 sont stimulés par le mélange Oct + Cit), le même effet est provoqué quelles que soient les concentrations des constituants.

Par ailleurs, nous avons observé que chaque mélange induit le même type d'interactions quel que soit le récepteur, suggérant que les effets observés sont plutôt caractéristiques de la nature du mélange que de celles du récepteur. Il est néanmoins délicat d'extrapoler nos résultats à l'ensemble des RO de mammifères car seules les réponses d'un petit nombre de RO ont été évaluées. Afin d'accroître nos connaissances sur les phénomènes impliqués dans l'encodage périphérique des mélanges odorants, il nous a semblé intéressant de poursuivre ces travaux en examinant les réponses d'un ensemble de RO au niveau de la muqueuse olfactive. Ce travail est présenté dans le chapitre qui suit.

Les résultats de ce chapitre concernant les RO humains ont fait l'objet d'un article soumis dans le journal « *Européen Journal of Neuroscience* »: Fouzia El Mountassir, Christine Belloir, Loïc Briand, Thierry Thomas-Danguin, Anne-Marie Le Bon (2013) Encoding odorant mixtures by human olfactory receptors.

Chapitre II : Activation des neurones sensoriels olfactifs par des mélanges binaires d'aldéhydes

I. Introduction

Au niveau de la muqueuse olfactive (MO), l'activation des NSO par une molécule odorante conduit à la genèse d'un message électrique qui est transmis au bulbe olfactif via le nerf olfactif, puis à diverses structures centrales. Le message qui est délivré au bulbe résulte le plus souvent de l'activation simultanée de plusieurs NSO, et donc de plusieurs RO, par le stimulus. En effet, il est aujourd'hui bien établi que chaque molécule odorante active une combinaison spécifique de NSO/RO (Duchamp et al., 1974 ; Malnic et al., 1999).

Comme les odeurs résultent généralement de la perception de mélanges de plusieurs molécules, on peut supposer que le codage du signal olfactif augmente en complexité en raison notamment d'interactions possibles entre les différentes molécules odorantes au niveau des NSO/RO. L'enregistrement de l'activité électrophysiologique (EOG) au niveau de la MO est un moyen de décrire les propriétés d'un ensemble de NSO et donc d'appréhender la réponse globale de l'ensemble des RO activés par un mélange. Cette approche, combinée à l'étude de la fonctionnalité de certains RO (cf chapitre I), devrait permettre de mieux comprendre les phénomènes qui sous-tendent l'encodage des mélanges au niveau périphérique en tenant compte notamment de l'intégration qui peut se produire au niveau des NSO.

Afin de mesurer les réponses d'un ensemble de neurones stimulés par les mélanges d'aldéhydes (Oct + Cit et Oct + Méth), nous avons mis en œuvre une technique d'enregistrement d'électro-olfactogramme. Cette technique consiste à recueillir, à l'aide d'une électrode dont la pointe est au contact de la MO, le potentiel de champ correspondant principalement aux potentiels générateurs d'un large échantillon de neurones olfactifs (Scott and Scott-Johnson, 2002). L'EOG est donc le résultat de la sommation de réponses olfactives individuelles. Les variations de l'amplitude des signaux EOG peuvent refléter une variation du nombre de neurones activés tout comme une variation de la réponse des neurones individuellement. La technique d'enregistrement d'EOG a été largement utilisée chez plusieurs espèces animales, comme la grenouille (Mozell et al., 1984) et le rat (Duchamp-Viret et al., 2000; Scott and Brierley, 1999). Les mesures d'EOG sont également réalisables chez l'Homme mais elles sont délicates à mettre en œuvre et nécessitent un environnement médicalisé (Hummel et al., 1996 ; Lapid et al., 2011). Pour cette raison, nous avons entrepris de réaliser ces études chez le rat.

II. Matériels et méthodes

Les enregistrements d'EOG sont effectués à la surface de la MO. Deux techniques de stimulation par les odorants peuvent être utilisées :

- l'EOG gazeux, qui consiste à amener les odorants à la surface de la muqueuse sous forme de gaz véhiculé dans de l'air saturé en eau ;
- l'EOG submergé, qui consiste à délivrer les odorants via le liquide physiologique perfusé en flux continu à la surface de la MO.

Nous avons choisi d'utiliser la technique d'EOG submergé car elle présente l'avantage de mieux contrôler les concentrations des odorants appliqués.

II.1 Préparation des solutions d'odorants et du tampon de perfusion

Pour chaque odorant (Tableau 1, chapitre I), une solution mère à 1 M est préparée dans du DMSO puis les solutions de travail sont amenées à la concentration souhaitée par dilutions successives ($1/10^{\text{ème}}$) dans le tampon de perfusion. La concentration finale de DMSO contenue dans la solution d'odorant n'excède pas 0,01%.

Le tampon de perfusion utilisé est un tampon physiologique de type Ringer élaboré pour maintenir en vie les tissus de mammifères. La composition est donnée dans le Tableau 3. Le pH du tampon est ajusté à 7,2 et l'osmolarité est ajustée à 320 mOsm.L^{-1} (osmomètre manuel, Löser, Berlin, Allemagne) avec du glucose.

Tableau 3 : Composition du tampon de perfusion.

Substance	Concentration finale (mM)
NaCl	140
KCl	5
MgCl ₂	2
CaCl ₂	2
HEPES	10
NaOH (10%)	ajuster le pH à 7,2
Glucose	ajuster à $310\text{-}320 \text{ mOsm.L}^{-1}$

II.2 Préparation de la muqueuse olfactive

Les expériences d'EOG ont été réalisées sur des rats mâles de souche Wistar âgés de 6 à 7 semaines. Les animaux sont euthanasiés par asphyxie au CO₂ à un débit de 5 L.min⁻¹ (dispositif Minerve) puis guillotins. Après avoir ôté la peau et la mâchoire inférieure de l'animal, on réalise une coupe sagittale de la boîte crânienne par deux incisions dans le sens rostro-caudal. La première du côté ventral est effectuée le long du palais et la seconde du côté dorsal le long de l'os septal, ce qui permet de dégager les cornets olfactifs. On obtient deux hémi-têtes (Figure 9). L'une des hémi-têtes est placée dans une boîte de pétri, sur de la pâte à modeler, de façon à ce que le plan de la muqueuse forme un angle de 50° à 70° par rapport à l'horizontale. La préparation est ensuite placée dans le poste d'enregistrement d'EOG. La deuxième hémi-tête est conservée à 4°C dans le liquide physiologique. Elle est utilisée lorsque les mesures sur la première hémi-tête sont terminées.

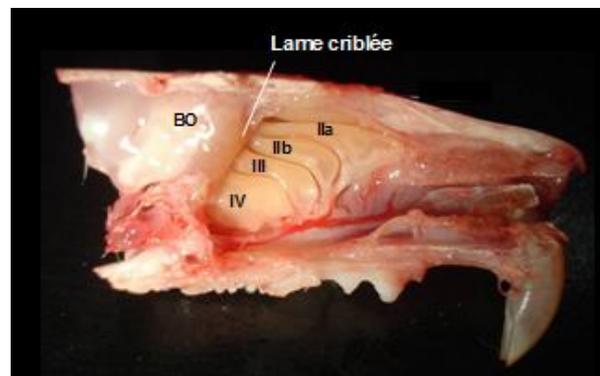


Figure 9 : Vue du système olfactif périphérique de rat après une coupe sagittale. On distingue quatre cornets de la muqueuse olfactive (cornets IIa, IIb, III et IV) et le bulbe olfactif (BO).

II.3 Descriptif du poste d'enregistrement

La chambre d'enregistrement est disposée sur une table antivibratoire équipée d'un plateau suspendu sur coussin d'air et entourée d'une cage de Faraday pour limiter les interférences électriques. Tous les enregistrements sont réalisés à température ambiante. La perfusion de l'hémi-tête avec le tampon physiologique est réalisée à un débit constant de $5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ grâce à une pompe péristaltique placée en dehors de la cage de Faraday (Minipuls 3, Gilson[®]) et à un système de goutte-à-goutte. Les odorants sont appliqués à l'aide d'un système de vanne type Rheodyne[®] équipée avec une boucle de $200 \mu\text{L}$. Après chargement de la solution odorante dans la boucle en circuit ouvert, la fermeture de la vanne permet d'introduire l'odorant dans le flux de perfusion qui arrive à la surface de l'épithélium olfactif *via* la pipette de stimulation. Le liquide de perfusion est évacué en continu par un système d'aspiration branché sur le vide d'air, ce qui évite l'immersion de la muqueuse olfactive dans le liquide (Figure 10).

Une électrode de référence en argent, en forme de pastille d'un diamètre de 80 mm (Phymep, France), recouverte d'une couche d'une solution saline gélifiée conductrice (Sigma Gel, Parker Laboratory), est placée sous l'hémi-tête.

L'électrode d'enregistrement est constituée d'une pipette en plastique remplie de gel conducteur dans laquelle est inséré un fil d'argent préalablement chloruré à l'aide d'une solution de chlorure ferrique. La résistance de la pipette d'enregistrement est comprise entre 1 et $5 \text{ M}\Omega$. Cette électrode, qui est fixée sur un micromanipulateur, est positionnée à la surface de la MO à l'aide d'un stéréomicroscope (Leica[™] Microsystèmes, Nanterre, France).

L'électrode d'enregistrement et l'électrode de référence sont reliées à un amplificateur différentiel (AMS Model 3000, Phymep) fonctionnant en mode continu (DC) avec un filtre coupe haut à 300 Hz. L'ensemble des enregistrements est acquis avec un gain de 1000. Le signal amplifié est envoyé vers le module d'acquisition. Il s'agit d'un convertisseur analogique/numérique (Digidata 1440, Molecular Devices) qui permet de convertir le signal de nature analogique en signal numérique. Le logiciel d'acquisition (Axoscope 10.2, Axon Instruments) permet d'enregistrer les signaux en temps réel. Les signaux sont numérisés avec une fréquence d'échantillonnage de 100 Hz. Un schéma simplifié du poste d'enregistrement est présenté dans la Figure 11.

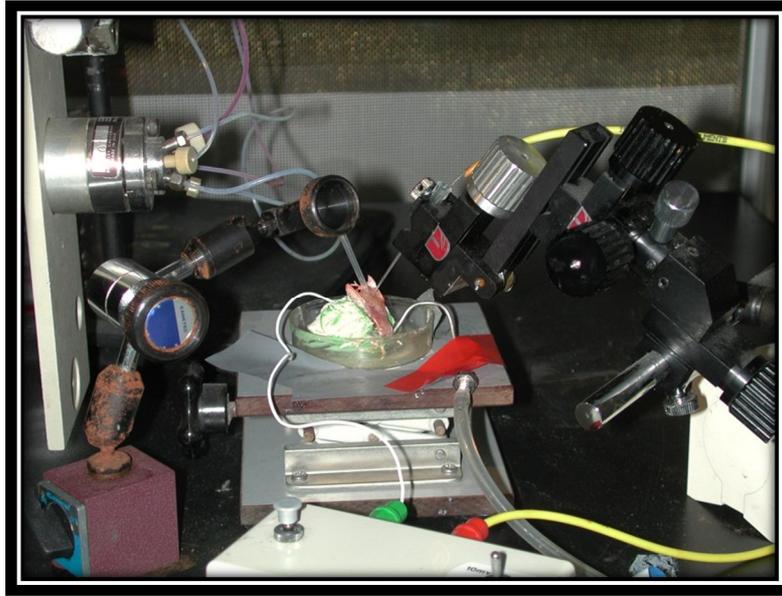


Figure 10 : Vue de la chambre d'enregistrement des signaux EOG.

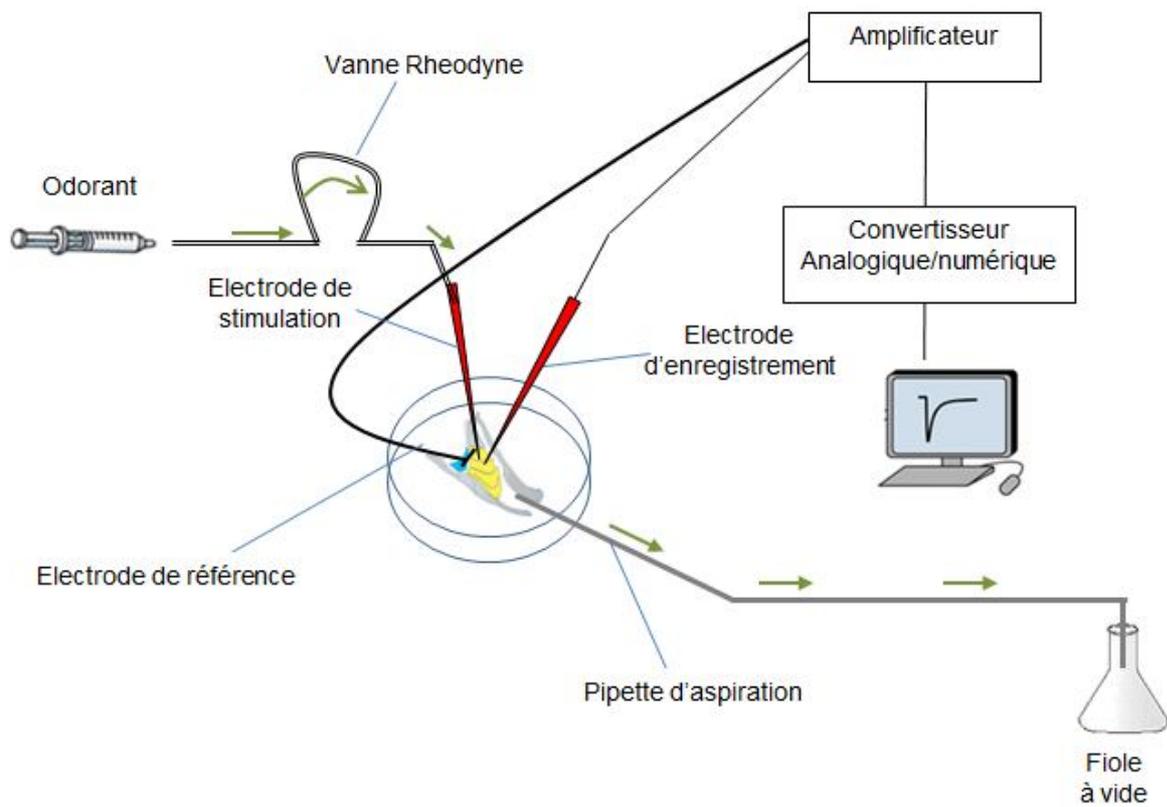


Figure 11: Représentation schématique du dispositif d'enregistrement d'EOG *ex-vivo*.

II.4 Analyse des enregistrements d'EOG

Les enregistrements d'EOG sont analysés grâce au logiciel Clampfit 10.2 (Molecular Devices). Lors de chaque séquence d'enregistrement, un potentiel de 1 mV est appliqué juste avant la stimulation odorante. Le signal recueilli permet de calibrer l'ensemble de la trace lors du traitement des données. La réponse obtenue est une dépolarisation ; elle 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. L'amplitude maximale du signal, exprimée en mV, est mesurée entre le début de la dépolarisation et le sommet de la déflexion (Figure 12).

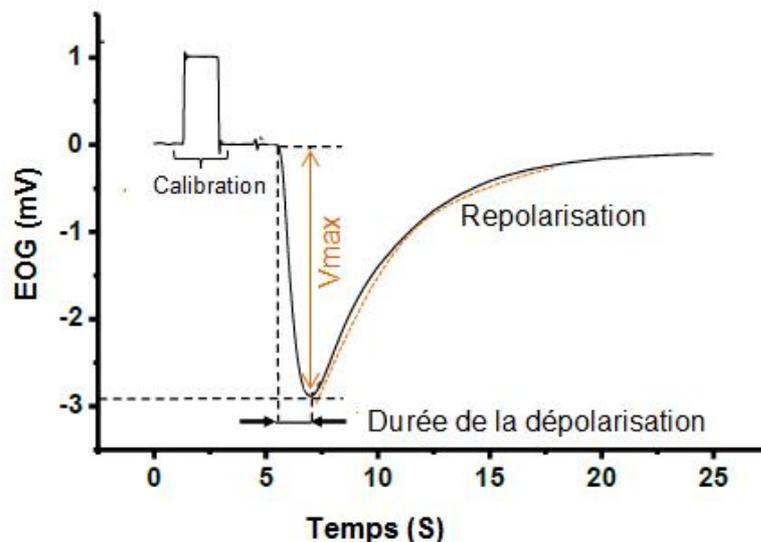


Figure 12 : Exemple de trace d'EOG obtenue lors de l'application d'un stimulus odorant.

L'application d'un stimulus odorant provoque une dépolarisation suivie d'une repolarisation à la surface de la muqueuse olfactive. Le stimulus de calibration de 1 mV est appliqué juste avant la stimulation odorante. La stimulation provoque une réponse avec un délai moyen de l'ordre de la milliseconde. V_{max} = amplitude maximale de la dépolarisation. L'amplitude et la durée de la dépolarisation dépendent du stimulus.

L'amplitude maximale du signal est normalisée par rapport à l'amplitude maximale du signal obtenu après application de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) à une concentration de 100 μM . Cette substance pharmacologique est un inhibiteur de l'activité phosphodiesterase. L'application d'IBMX provoque une dépolarisation du neurone via les canaux cationiques couplés aux nucléotides cycliques (CNG) et aux canaux chlore calcium-dépendants. Son utilisation permet de mesurer la fonctionnalité des voies de transduction de la muqueuse olfactive et de prendre en compte les variations interindividuelles des réponses aux odorants ainsi que la perte de sensibilité de la muqueuse au cours de l'expérience (Munger et al., 2009 ; Spehr et al., 2006).

Lors de chaque expérience, une solution de DMSO 0,01% est appliquée afin d'évaluer l'effet de ce solvant utilisé pour la dissolution des molécules odorantes. Une légère dépolarisation ($\sim 0,1$ mV) est induite par cette solution, tout comme par le Ringer seul. Cette dépolarisation est due à une perturbation du flux de tampon de perfusion provoquée par l'ouverture de la vanne.

II.5 Protocole expérimental

Les signaux EOG générés par les molécules appliquées isolément (Oct, Cit et Méth) et par les mélanges binaires (Oct + Cit et Oct + Méth) ont été enregistrés au niveau du cornet Iib, du côté dorsal. Des expériences préliminaires effectuées avant de commencer cette étude ont montré que ce site présentait de bonnes réponses aux 3 molécules étudiées.

Cinq concentrations de chaque odorant ont été testées (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M) ainsi que 17 mélanges correspondant à différentes ratios (Tableau 4). Les effets des molécules seules et des mélanges ont été mesurés sur chaque héli-tête.

Tableau 4: Présentation des mélanges d'odorants étudiés et correspondance entre concentrations et codes utilisés pour la représentation des résultats.

		Concentration de Citronellal / Méthional (M)				
		10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
		Méth1	Méth2	Méth3	Méth4	Méth5
		Cit1	Cit2	Cit3	Cit4	Cit5
Concentration d'Octanal(M)						
10^{-8}	Oct1	Oct1 Cit1 Oct1 Méth1	Oct1 Cit2 Oct1 Méth2	Oct1 Cit3 Oct1 Méth3		Oct1 Cit5 Oct 1 Méth5
10^{-7}	Oct2	Oct2 Cit1 Oct2 Méth1		Oct2 Cit3 Oct2 Méth 3		
10^{-6}	Oct3	Oct3 Cit1 Oct3 Méth 1	Oct3 Cit2 Oct3 Méth2	Oct3 Cit3 Oct3 Méth3	Oct3 Cit4 Oct3 Méth4	Oct3 Cit5 Oct3 Méth5
10^{-5}	Oct4			Oct4 Cit3 Oct4 Méth3		Oct4 Cit5 Oct4 Méth5
10^{-4}	Oct5	Oct5 Cit1 Oct5 Méth1		Oct5 Cit3 Oct5 Méth3	Oct5 Cit4 Oct5 Méth4	Oct5 Cit5 Oct5 Méth5

Les odorants seuls (de la plus faible à la plus forte concentration) ont été appliqués avant les mélanges. Un intervalle de repos de 2 min est alloué entre deux stimulations pour éviter une saturation de la MO. La séance d'enregistrement est répartie en six séries de quatre à cinq stimulations successives, chaque série d'enregistrement débutant et se terminant par l'enregistrement du signal généré par l'IBMX (100 μ M). Un schéma simplifié du déroulement d'une séance d'enregistrement d'EOG est présenté Figure 13.

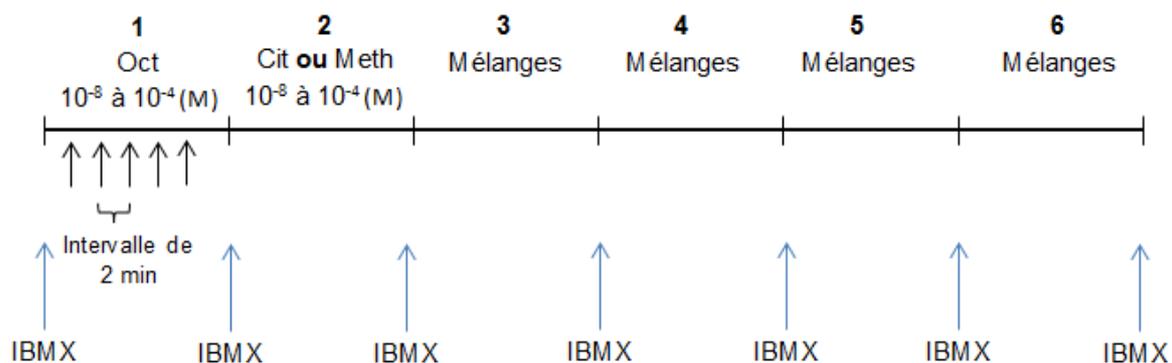


Figure 13 : Protocole expérimental mis en œuvre lors de chaque séance d'EOG.

II.6 Expressions des résultats

Afin d'étudier l'activation des NSO par les mélanges binaires, nous avons utilisé deux types de représentations graphiques :

- Tout d'abord nous avons calculé et représenté pour chaque stimulus l'amplitude d'EOG moyenne sur l'ensemble des stimuli ainsi que l'erreur type sur cette moyenne (ES).

- Puis nous avons représenté l'amplitude d'EOG moyenne et l'ES des mélanges dans la représentation [$\sigma = f(\tau)$] proposée par Patte et Laffort (1979) (cf Chapitre I). Pour cela on considère trois valeurs d'EOG : l'EOG induite par le mélange (EOG_{mix}), l'EOG induite par l'Oct seul (EOG_{Oct}) et l'EOG induite par le Cit (EOG_{Cit} ; respectivement Méth $EOG_{Méth}$). L'EOG induite par le mélange (EOG_{mix}) est rapportée à la somme des amplitudes induites par les deux constituants Oct et Cit analysés séparément ($EOG_{Oct} + EOG_{Cit}$). Il s'agit du paramètre sigma : $\sigma = EOG_{mix} / (EOG_{Oct} + EOG_{Cit})$. Le paramètre σ est exprimé en fonction du paramètre Tau (τ) qui correspond au rapport entre l'amplitude induite par l'un des constituants (Oct par exemple pour τ_{Oct}) et la somme des amplitudes de chaque substance perçue hors mélange [ex : $\tau_{Oct} = EOG_{Oct} / (EOG_{Oct} + EOG_{Cit})$]. Ce paramètre reflète la proportion de l'amplitude relative d'une substance odorante. Lorsque $\tau = 0,5$ le mélange est dit iso-intense car il est constitué par les deux constituants à la même amplitude ($EOG_{Oct} = EOG_{Cit}$).

III. Résultats

- **Mélange Octanal + Citronellal**

Les réponses électrophysiologiques d'une population de neurones stimulés par des concentrations croissantes d'Oct et de Cit ainsi que par 17 mélanges binaires ont été mesurées au niveau du cornet IIb. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 14.

Les mesures d'amplitudes maximales des signaux EOG induits par les molécules appliquées isolément montrent que la stimulation de la MO dépend de la concentration des deux odorants. Les résultats indiquent que l'Oct et le Cit activent la MO dès 10^{-8} M et que les signaux générés par l'Oct sont plus faibles que ceux générés par le Cit.

L'intensité des signaux EOG générés par les mélanges Oct + Cit est inférieure à la somme arithmétique des réponses obtenues avec les odorants seuls. Lorsque l'on compare l'amplitude des signaux EOG induits par les mélanges contenant des concentrations égales d'Oct et de Cit (ratio de concentration 1/1) à celles générées par les constituants appliqués séparément, on observe que les signaux induits par ces mélanges sont proches, voire identiques, de ceux provoqués par le Cit seul (Figure 14A). Les signaux EOG des mélanges contenant les ratios 1/10 et 10/1 se situent globalement à un niveau intermédiaire entre les signaux des molécules appliquées isolément. Seul le mélange Oct2 Cit1 (contenant 10^{-7} M Oct et 10^{-8} M Cit) présente une amplitude d'EOG supérieure à celle du constituant le plus efficace. Les mélanges contenant un ratio 1/100 génèrent des signaux intermédiaires entre ceux des composants pris individuellement. Par contre, les mélanges contenant un ratio 100/1 induisent un signal supérieur à ceux provoqués par les constituants seuls. En ce qui concerne les forts ratios, le mélange contenant le ratio 1/10000 présente un effet intermédiaire tandis que le mélange contenant le ratio 10000/1 induit un signal EOG supérieur à celui provoqué par le composé le plus efficace (Oct).

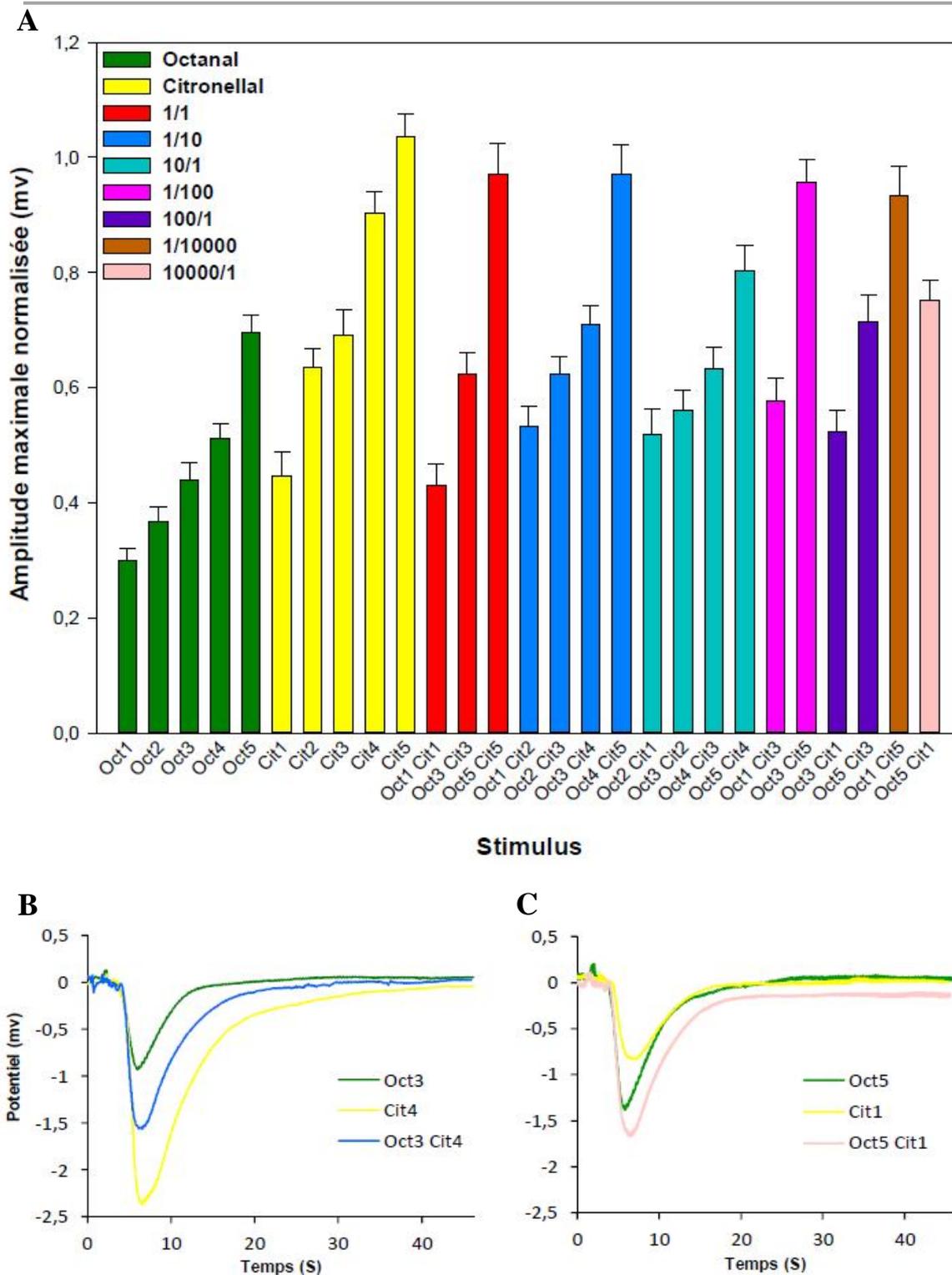


Figure 14 : Amplitudes des signaux EOG générés par l'Octanal (Oct) et le Citronellal (Cit) et leurs mélanges.

A-Amplitude moyenne des signaux générés par l'Octanal et le Citronellal appliqués seuls ou en mélange.

Les valeurs représentent la moyenne \pm ES de 12 mesures (6 rats ; 2 héli-têtes / rat). La valeur du signal induit par le DMSO est 0,18 mV.

B-Exemple d'enregistrements EOG montrant un effet de compromis.

C-Exemple d'enregistrements EOG montrant un effet d'addition partielle.

Afin de faciliter l'interprétation de ces résultats, nous avons également utilisé la présentation $[\sigma = f(\tau)]$ de Patte et Laffort pour visualiser les interactions produites par les mélanges Oct + Cit au niveau de la MO de rat.

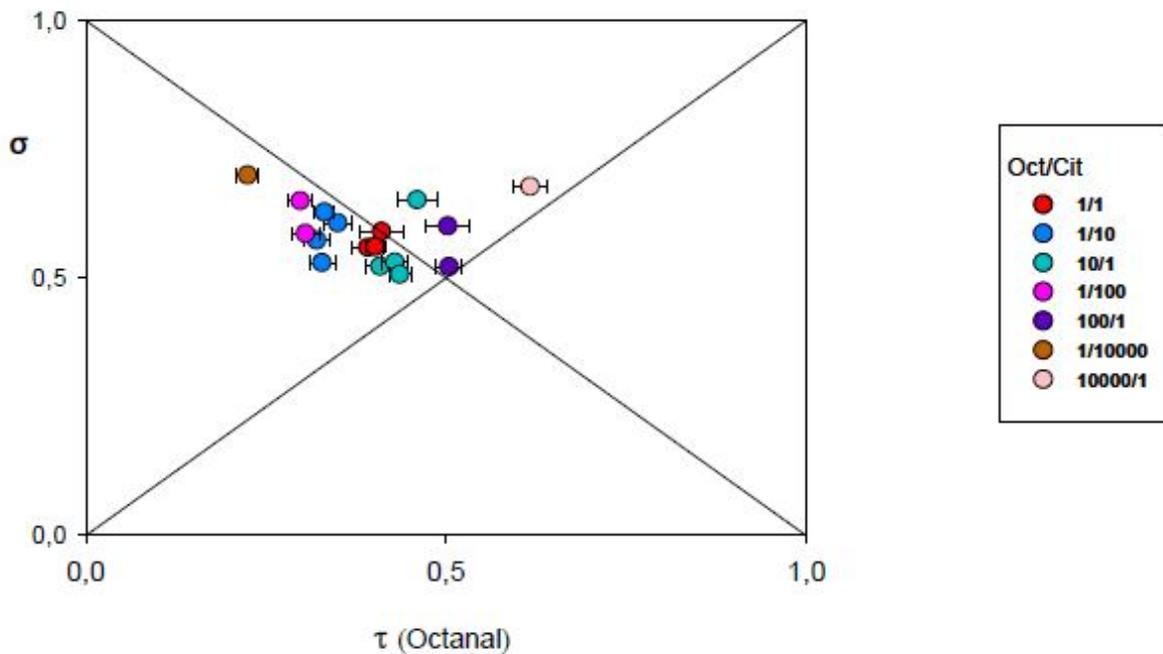


Figure 15: Amplitude des signaux EOG générés par les différents ratios du mélange Oct + Cit au niveau de la MO, selon la représentation $[\sigma = f(\tau_{\text{Octanal}})]$.

La Figure 15 fait clairement apparaître que le mélange Oct + Cit induit des effets de compromis et d'addition partielle au niveau de la MO. Lorsque l'Oct est en mélange avec le Cit aux ratios 1/1 – 1/10 – 1/100 – 1/10000 et 10/1, la réponse de la MO à ces mélanges se trouve dans la zone qui correspond à un effet de compromis, c'est-à-dire que les mélanges induisent des réponses intermédiaires entre les réponses aux odorants seuls. Par contre, les réponses des mélanges contenant les ratios 100/1 et 10000/1, ainsi que la réponse de l'un des mélanges 10/1 (Oct2 Cit1), sont supérieures à celles des constituants appliqués individuellement ; ces mélanges provoquent des effets d'addition partielle. D'une manière globale, on peut noter que lorsque le signal EOG produit par l'Oct est moins intense que celui provoqué par le Cit ($\tau_{\text{Oct}} < 0,5$), le mélange induit majoritairement un effet de compromis. En revanche, lorsque $\tau_{\text{Oct}} \geq 0,5$ (réponse importante à l'Oct), le mélange induit un effet d'addition partielle.

- **Mélange Octanal + Méthional**

Le même protocole expérimental a été mis en œuvre pour évaluer les effets du mélange Oct + Méth : la MO de rat a été stimulée par les molécules seules (Oct et Méth, cinq concentrations croissantes) puis par 17 mélanges binaires. Les résultats obtenus sont présentés Figure 16.

Les mesures de l'amplitude maximale des signaux EOG obtenus après application d'Oct à différentes concentrations montrent, comme précédemment, un effet dose-dépendant (Figure 16). L'amplitude maximale des signaux varie de ~0,4 à ~0,8 mV. L'amplitude maximale des signaux EOG induits par le Méth est plus faible que celle générée par l'Oct (~0,35 mV) et ne varie pas en fonction de la concentration. Seule la plus forte concentration testée (10^{-4} M) provoque une légère augmentation du signal (~0,45 mV).

L'amplitude des signaux EOG générés par les mélanges Oct + Méth est inférieure à la somme arithmétique des réponses obtenues avec les odorants seuls. Les mélanges contenant un ratio 1/1 induisent un signal supérieur ou équivalent à celui provoqué par l'Oct seul. En ce qui concerne les ratios 1/10 et 10/1, l'amplitude du signal généré par ces mélanges est supérieure à celle produite par l'Oct ou intermédiaire entre celles induites par les constituants du mélange appliqués seuls : à faible concentration d'Oct dans le mélange (cas des mélanges Oct1 Méth1, Oct2 Méth3 et Oct2 Méth1), la réponse des neurones est supérieure à celle des molécules seules tandis qu'à forte concentration d'Oct (Oct3 Méth4, Oct4 Méth5, Oct3 Méth2, Oct4Méth3, Oct5Méth4), les réponses des mélanges se situent entre les réponses des 2 constituants. Dans le cas des ratios 1/100 et 100/1, le mélange induit une réponse supérieure à celles des odorants seuls, sauf le mélange Oct5 Méth3 qui présente un signal intermédiaire. Les mélanges contenant les ratios 1/10000 et 10000/1 induisent une réponse supérieure à celles des constituants.

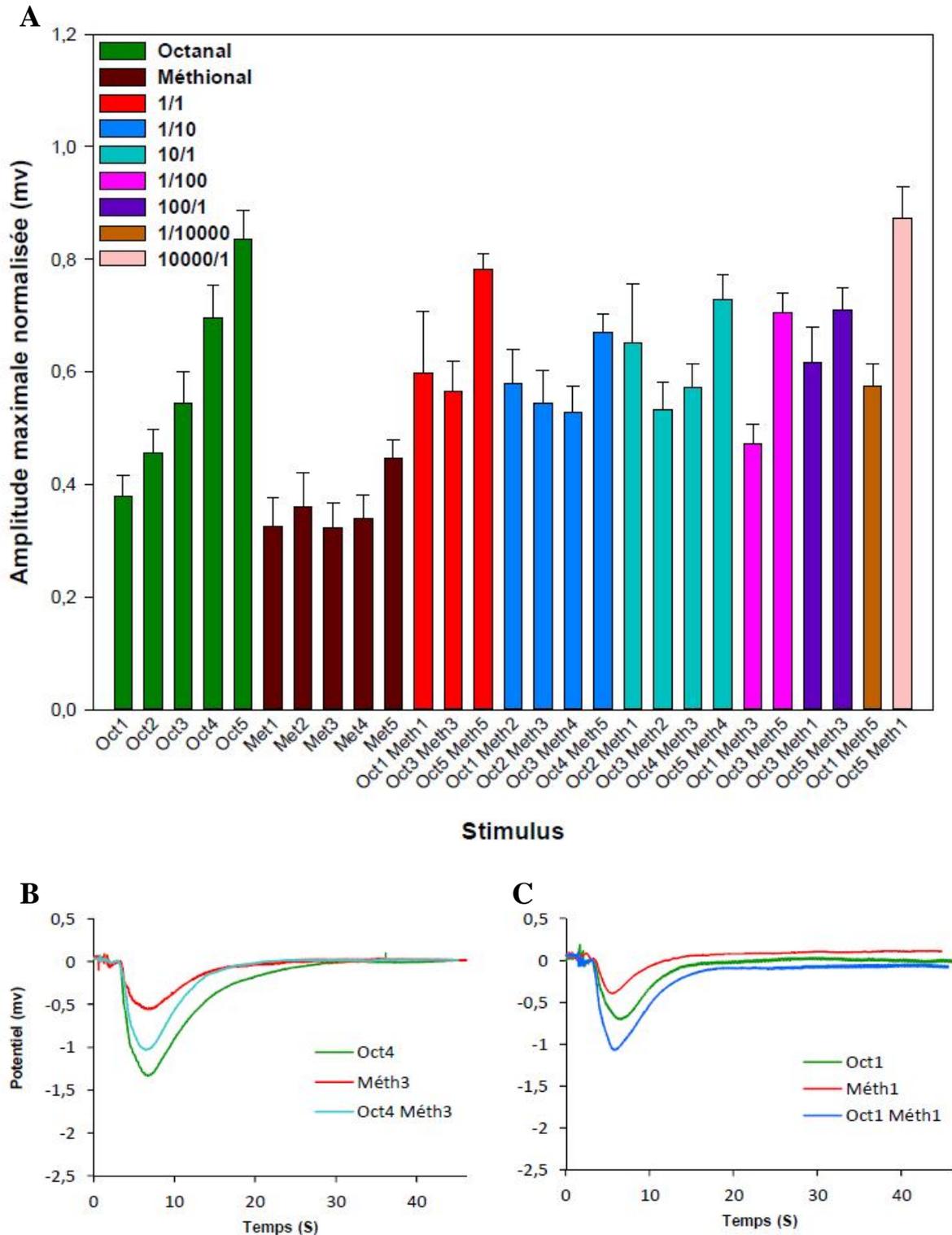


Figure 16: Amplitudes des signaux EOG générés par l'Octanal (Oct) et le Méthional (Méth) et leurs mélanges.

A-Amplitude moyenne des signaux générés par l'Octanal et le Méthional appliqués seuls ou en mélange. Les valeurs représentent la moyenne \pm ES de 9 mesures (6 rats ; 1 ou 2 hémisphères / rat). La valeur du signal induit par le DMSO est 0,1 mV.

B-Exemple d'enregistrements EOG montrant un effet de compromis.

C-Exemple d'enregistrements EOG montrant un effet d'addition partielle.

En accord avec ces observations, la représentation de ces résultats selon la présentation synthétique [$\sigma = f(\tau)$] (Figure 17) met en évidence des effets de compromis et d'addition partielle. On remarque que lorsque $0,4 < \tau_{\text{Oct}} < 0,6$, c'est-à-dire lorsque le signal EOG produit par les deux molécules seules est proche, la réponse aux mélanges se trouve dans la zone d'addition partielle (réponse supérieure à celle de l'Oct et de Méth seuls). Au contraire, dans les mélanges incluant de fortes concentrations d'Oct et donc une réponse de la MO a priori principalement due à cet odorant ($\tau_{\text{Oct}} > 0,6$), le mélange induit des effets de compromis (réponse inférieure à celle de l'Oct mais supérieure à celle du Méth).

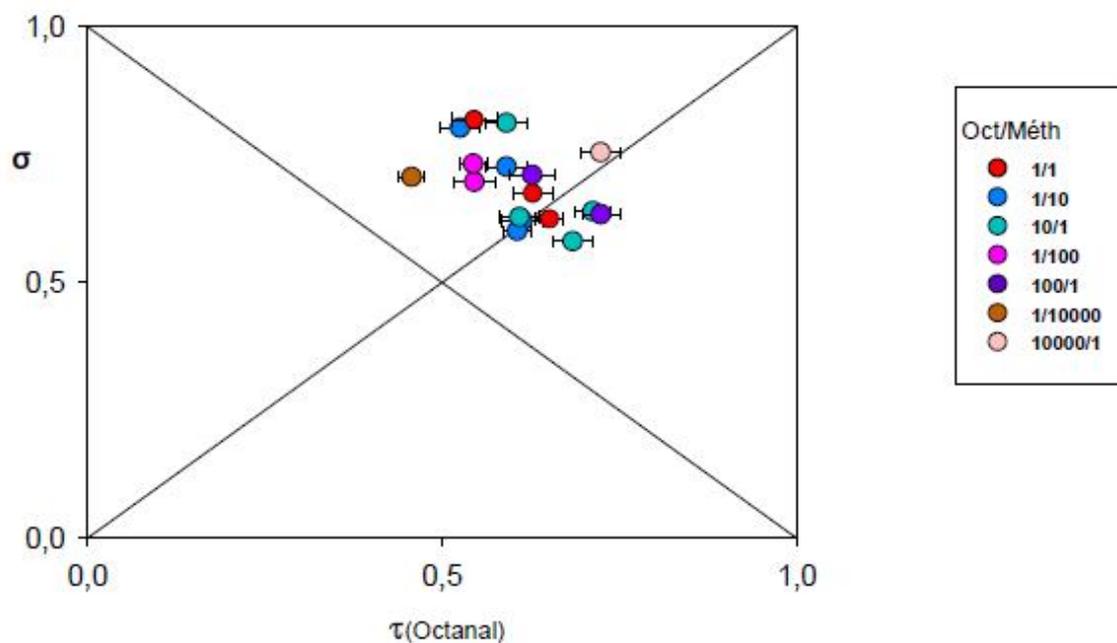


Figure 17 : Amplitude des signaux EOG générés par les différents ratios du mélange Oct + Méth, selon la représentation [$\sigma = f(\tau_{\text{Octanal}})$].

IV. Discussion

Cette étude électrophysiologique démontre que l'Oct, le Cit et le Méth induisent des interactions au niveau des NSO lorsqu'ils sont appliqués en mélange, c'est-à-dire que la réponse de la MO n'est pas la simple somme des réponses des composés appliqués seuls. Les deux mélanges étudiés provoquent des effets de compromis et d'addition partielle en fonction des concentrations des odorants dans le mélange. Les interactions générées par le mélange Oct + Cit sont similaires à celles mises en évidence au niveau des RO étudiés de manière individuelle (cf chapitre I). Par contre, les réponses des NSO stimulés par le mélange Oct + Méth se différencient de celles observées au niveau des RO.

Les propriétés de ces mélanges ont été étudiées au niveau du cornet IIb, du côté dorsal. Nous avons retenu ce site car nous avons observé qu'à cet endroit, les trois molécules produisent individuellement des signaux EOG relativement importants. Cette observation est en accord avec des études antérieures qui ont montré que plusieurs aldéhydes, dont l'Oct, induisent des signaux EOG au niveau de différents cornets, aussi bien du côté dorsal que ventral (Abaffy and Defazio, 2011; Scott et al., 2000 ; Scott et al., 1996).

La MO répond différemment aux molécules appliquées seules.

L'amplitude des signaux EOG induits par les odorants appliqués isolément varie selon le composé et, dans le cas de l'Oct et du Cit, en fonction de la concentration. Nous avons en effet observé que la MO répond de manière plus importante à l'Oct et au Cit qu'au Méth. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'étude fonctionnelle *in vitro* (cf chapitre I) qui a montré que, quel que soit le RO, l'Oct et le Cit sont de meilleurs agonistes que le Méth. Comme les réponses des NSO reflètent les propriétés des récepteurs qu'ils expriment, (Serizawa et al., 2000 ; Serizawa et al., 2004), cela nous permet de poser l'hypothèse que la zone du cornet IIb que nous avons analysée exprime un nombre important de RO sensibles à l'Oct et au Cit, tels le récepteur r17 ou des orthologues des récepteurs humains que nous avons étudiés (OR1G1, OR52D1, OR2W1 et OR1A1). En effet, il a été montré qu'un grand nombre de NSO de mammifères peuvent être activés par des aldéhydes, dont l'Oct et le Cit (Araneda et al., 2004 ; Nara et al., 2011). Araneda et collaborateurs ont rapporté qu'à 30 μ M, l'Oct

active près 6% des NSO de rat et que ce taux peut atteindre 21% quand la concentration d'Oct atteint 1000 μM (Araneda et al., 2004). Ces auteurs ont également montré que de nombreux NSO répondant à l'Oct peuvent également être activés par d'autres aldéhydes comme le Cit.

Nous avons constaté que le Méth induit une faible réponse au niveau des NSO et que l'amplitude des signaux ne varie pas en fonction de la concentration. Cela a aussi été observé au niveau des autres cornets de la MO (résultats préliminaires non présentés). Il est difficile d'interpréter ces résultats car à notre connaissance il n'existe pas d'autres études sur l'activation des NSO par ce composé. Le Méth est un aldéhyde qui a la particularité de contenir un atome de soufre. La présence de cet atome de soufre confère peut-être à cet aldéhyde des propriétés de liaison aux RO particulières qui le rendent peu actif (par exemple liaison au niveau d'un site secondaire dans la poche du récepteur). Il est possible également que la conformation du Méth ne soit pas optimale pour activer significativement un RO. Une étude des propriétés d'activation du récepteur de rat r17 a montré que seuls les aldéhydes répondant à certains critères de taille et d'encombrement stérique ont la capacité d'activer ce récepteur (Peterlin et al., 2008). Les molécules de faible longueur comme le pentanal ou l'hexanal sont peu ou pas actives. Le Méth (qui contient 4 C et 1 S) peut être considéré comme un analogue du pentanal, et aurait de ce fait les caractéristiques d'un faible agoniste du récepteur r17.

Les deux mélanges induisent des effets d'hypo-addition au niveau de la MO.

Lorsque la MO est stimulé par le mélange Oct + Cit, les différents ratios testés provoquent des effets de compromis dans 76% des cas et des effets d'addition partielle dans 24% des cas. Ces effets varient en fonction des proportions des composés dans le mélange. Lorsque la concentration d'Oct dans le mélange est faible par rapport à celle du Cit, correspondant notamment à une plus forte activation de la MO par Cit par rapport à Oct ($\tau < 0,5$), la réponse de la MO au mélange est inférieure à la réponse au Cit seul. Cet effet de compromis résulte probablement d'une action suppressive de l'Oct sur la réponse des neurones au Cit. On peut supposer que l'Oct entre en compétition avec le Cit au niveau des RO/NSO, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'amplitude du signal EOG induit par le Cit. L'Oct provoquerait une réduction du nombre de NSO activés et/ou une réduction de

l'efficacité de réponse des NSO. Ce type d'interaction peut être interprété comme un effet de soustraction partielle car il y a inhibition partielle de la réponse au Cit par l'Oct.

Nous avons également observé que quatre mélanges sur les dix-sept mélanges testés (24% des cas) provoquent un effet d'addition partielle, c'est-à-dire des réponses supérieures à celle du constituant le plus efficace (Figure 15). Ces mélanges contiennent une forte concentration d'Oct (ratios Oct/Cit = 10/1, 100/1 et 10 000/1). Dans ce cas, les effets des deux odorants semblent s'additionner. Toutefois, cet effet d'addition reste limité car on est loin d'un effet d'addition complète. On peut noter que deux de ces mélanges (Oct3Cit1 et Oct5Cit3, ratio 100/1) ont la particularité de contenir des constituants induisant des signaux EOG équivalents lorsqu'ils sont hors mélanges. Ce sont des mélanges que l'on pourrait qualifier de mélanges iso-réponse. L'augmentation de la réponse de la MO induite par ces mélanges peut résulter d'un accroissement de l'efficacité de réponse de certains neurones ou d'une augmentation du nombre de NSO/RO recrutés lorsque la concentration d'Oct dans le mélange est plus importante.

Par ailleurs, bien que les concentrations d'Oct et de Cit utilisées au cours des deux études (étude fonctionnelle *in vitro* et EOG) ne soient pas strictement identiques, ce mélange provoque les mêmes types d'interactions (compromis, addition partielle) au niveau des RO testés et d'une population de neurones. Cela confirme que les effets ne sont pas influencés par la nature des récepteurs mais plutôt par les caractéristiques propres à ces deux odorants. Aucun effet de soustraction tel qu'observé au niveau du récepteur OR1A1 n'a été mis en évidence au niveau des NSO. La technique d'enregistrement d'EOG mesure les réponses d'un ensemble de neurones suite à l'application d'odorants sur la MO. Le signal observé correspond de ce fait à l'effet global d'un stimulus sur un groupe de cellules mais cela n'implique pas que tous les neurones répondent de la même manière. Il est possible que des effets de soustraction soient induits au niveau d'un petit nombre de NSO mais que globalement, l'intensité de cet effet soit masquée par l'intensité des autres types d'interaction qui se produisent majoritairement au niveau des autres neurones.

En ce qui concerne le mélange Oct + Méth, des effets d'addition partielle et de compromis ont été observés dans 82% et 18% des cas, respectivement. Contrairement aux résultats obtenus *in vitro* (cf chapitre I), aucun effet de synergie n'a été mis en évidence. Ce mélange provoque majoritairement des effets d'addition partielle : bien que le Méth soit un faible agoniste, lorsqu'il est en mélange avec l'Oct, la réponse de la MO est supérieure à celle induite par l'Oct seul. Cet effet est d'autant plus important que la concentration d'Oct dans le mélange est faible. L'effet d'addition partielle observé pourrait être la résultante de multiples interactions produites au niveau de la population neuronale analysée. On peut faire l'hypothèse que le mélange Oct + Méth provoque des effets synergiques sur une partie de la population, mais que des effets d'hypo-addition sont également induits au niveau d'autres NSO. En effet, il a été montré que les NSO répondant à l'Oct présentent des profils pharmacologiques variés (Araneda et al., 2004), ce qui suggère divers profils de réponse en cas de stimulation par un mélange. Il est donc possible que les effets d'addition partielle observés en EOG soient la résultante de divers types d'interactions, les effets d'hypo-addition étant majoritaires et influençant de ce fait le signal global. Une tout autre hypothèse est que l'on assiste à un phénomène de saturation du processus de dépolarisation qui empêcherait d'observer un effet de synergie au niveau des NSO et que seul l'effet d'addition partielle serait observé.

Quelques effets de compromis sont observés lorsque le mélange contient des concentrations d'Oct et de Méth élevées, comme dans le cas des mélanges Oct5 Méth3 et Oct5 Méth4. Lorsqu'un couple d'odorants est appliqué en mélange, le type d'interaction qu'ils effectuent peut varier en fonction de leur concentration respective. Il a été montré pour le couple d'odorants cinéole + menthone qu'il induit un effet d'addition pour de faibles concentrations, tandis que pour des concentrations fortes, une hypo-addition se met en place (Duchamp-Viret et al., 2003). Ceci suggère que d'autres mécanismes se mettent en place lorsque les NSO sont stimulés par de fortes concentrations.

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine des effets observés.

Au niveau cellulaire et moléculaire, plusieurs mécanismes sont probablement impliqués dans la réponse des NSO à ces mélanges binaires d'odorants. Une étude de

modélisation des réponses de NSO de mammifères suggère qu'au moins deux processus différents seraient impliqués dans la réponse des NSO/RO à des mélanges binaires d'odorants : un mécanisme « compétitif » lorsque les deux constituants du mélange agissent au niveau du même site de liaison du récepteur et un mécanisme « non compétitif » lorsque l'un des constituants agit sur un autre site de liaison, notamment des sites allostériques (Rosparis et al., 2008). Nous ne détaillerons pas ces différents mécanismes ici car ils ont été présentés dans la discussion du chapitre I.

La coexistence de différentes voies de transduction du signal peut aussi expliquer les effets observés au niveau des NSO. Il a été montré que le citral inhibe l'effet activateur de l'octanol via la voie PI3K qui conduit à la formation de PIP3 dans les NSO de souris (Ukhanov et al., 2011; Ukhanov et al., 2010). Dans ces études, Ukhanov et collaborateurs ont montré que l'action suppressive du citral sur la réponse de l'octanol est complètement perturbée lorsque la voie PI3K est bloquée (Ukhanov et al., 2010). Un certain nombre d'autres odorants auraient également la propriété d'activer cette voie (Ukhanov et al., 2013). Ces auteurs suggèrent que la voie PI3K régulerait négativement la voie AMPc et contribuerait ainsi à réduire le niveau d'activation des NSO. Ces observations sont à rapprocher d'une étude qui a montré que des odorants ayant des propriétés de masquage chez l'Homme peuvent bloquer des canaux CNG dans des NSO d'amphibien *in vitro* (Takeuchi et al., 2009). Le blocage des canaux CNG observé dans cette étude pourrait être déclenché par l'activation de la PI3K car il a été démontré que le PIP3 produit par cette enzyme a la capacité de réguler négativement les canaux CNG (Zhainazarov et al., 2004). Par conséquent, il est possible que l'activation de la voie PI3K soit responsable de certains effets suppressifs engendrés par les mélanges que nous avons étudiés. L'Oct aurait en effet la capacité d'inhiber l'activité de certains NSO de rat *via* la voie PI3K (Ukhanov et al., 2013).

En résumé, cette étude démontre que les mélanges d'aldéhydes que nous avons étudiés (Oct + Cit et Oct + Méth) induisent différents types d'hypo-addition au niveau des NSO de rat. Nous pouvons conclure que les caractéristiques des mélanges sont intégrées au niveau périphérique et que ces propriétés ne se déduisent pas aisément des propriétés des composés pris individuellement. Notre objectif ultime étant de mettre en regard les interactions périphériques induites par ces deux mélanges avec des réponses comportementales, nous avons ensuite réalisé une étude psychophysique chez l'Homme. Cette étude est présentée dans le chapitre suivant.

Chapitre III : Etude psychophysique des mélanges binaires d'aldéhydes

I. Introduction

Les études d'imagerie calcique et d'EOG que nous avons réalisées et qui sont décrites dans les chapitres I et II montrent que les deux mélanges binaires Oct + Cit et Oct + Méth entraînent des interactions au niveau des RO et des NSO. Des effets d'hypo-addition et d'hyper-addition ont été observés au niveau des RO selon les proportions et les concentrations des constituants dans les mélanges, tandis que seuls des effets d'hypo-addition ont été observés au niveau de la réponse des NSO.

A des niveaux supérieurs d'intégration, les données disponibles dans la littérature concernant le mélange Oct + Cit reposent sur des études comportementales de généralisation chez le rat (Kay et al., 2003). Dans cette étude, il s'avère que les mélanges induisent des interactions qui dépendent des ratios de concentration des odorants. Ainsi, les mélanges contenant majoritairement du Cit ne sont pas perçus comme significativement différents du Cit seul. Il en est de même pour l'Oct lorsqu'il est largement majoritaire dans le mélange. En d'autres termes, dans ces mélanges, il y a un masquage de l'odeur du composé minoritaire par le composé majoritaire. Lorsque le ratio des deux odorants est plus équilibré (proche de 1/1), alors la perception est synthétique, c'est-à-dire que l'odeur du mélange est différente de celles des composantes. Dans une étude psychophysique conduite chez l'Homme, il a été montré que l'odeur de l'Oct masque celle du Cit (Burseg and de Jong, 2007). Les résultats que nous avons obtenus, au niveau des NSO, mais aussi des RO pour le récepteur r17 de rat, montrent que le mélange Oct + Cit entraîne exclusivement de l'hypo-addition et notamment du compromis dans 72% des cas. Les résultats obtenus avec les RO humains montrent également de l'hypo-addition, du compromis et de la soustraction, ce qui pourrait être compatible avec l'idée d'un masquage.

Dans le cas du second mélange, Oct + Méth, il a été montré dans le cadre d'une étude sensorielle chez l'Homme que l'odeur de l'Oct pouvait, à certaines concentrations, masquer celle du Méth (Burseg and de Jong, 2009). Nos résultats concernant l'activation de 4 RO humains par ce mélange montrent principalement des phénomènes d'hyper-addition ce qui semble peu compatible avec le masquage observé au niveau intégré.

Un des objectifs de la thèse étant de tester l'hypothèse selon laquelle les interactions observées au niveau intégré de la perception peuvent s'expliquer, au moins en partie, par les interactions lors du codage des mélanges de composés odorants, nous avons donc décidé de mener des expérimentations psychophysiques chez l'Homme pour mettre en évidence les interactions perceptives dans les mélanges Oct + Cit et Oct + Méth. Dans le cas du mélange Oct + Cit, si les données publiées sont assez complètes en termes de ratios testés, les données ne sont disponibles que chez le rat (Kay et al., 2003). Chez l'Homme, comme pour le mélange Oct + Méth, les données disponibles ne concernent qu'un seul niveau de concentration pour l'Oct et trois pour le Cit (Burseg et al., 2008) ou le Méth (Burseg and de Jong, 2009), ce qui est largement insuffisant pour caractériser le mélange et les interactions perceptives qu'il peut induire. C'est pourquoi il s'est avéré nécessaire d'avoir des données les plus complètes possibles chez l'Homme.

L'objectif de ce chapitre est donc de décrire les études psychophysiques qui ont été réalisées avec des sujets humains volontaires afin d'évaluer les caractéristiques psychophysiques des mélanges Oct + Cit et Oct + Méth en termes d'interactions quantitatives et qualitatives, mais aussi de valence hédonique. Les stimuli olfactifs ont été délivrés à l'aide d'un olfactomètre à dilution dynamique multivoies qui permet de mélanger les deux constituants du mélange dans des proportions et des concentrations déterminées et dans des conditions physico-chimiques contrôlées. Ce choix technique a été opéré de manière à pouvoir balayer une large gamme de concentrations et de ratios des deux odorants dans les mélanges, et cela de manière parallèle aux travaux menés sur les RO et les NSO.

II. Matériels et méthodes

II.1 Sujets participant à l'étude

Pour cette étude, les stimuli ont été évalués par des sujets dits « naïfs », car ils n'avaient aucune expertise en olfaction ou en analyse sensorielle. Les sujets ont été recrutés via des annonces distribuées sur le campus de l'Université de Dijon. Cinquante-quatre candidats ont été présélectionnés suite un questionnaire téléphonique. Ils déclaraient notamment ne présenter aucun trouble de l'odorat et aucune allergie. Ces candidats ont été soumis à des tests de sélection de manière à former un panel réduit de sujets les plus aptes à réaliser nos évaluations. Au total 5 tests de sélection ont été réalisés par les candidats lors d'une séance sensorielle d'une durée de 1h.

II.1.1 Test I : test européen de la capacité olfactive (ETOC)

Pour pouvoir écarter les sujets insensibles aux odeurs (anosmie ou hyposmie), un test permettant d'estimer les capacités olfactives a été réalisé [Test ETOC (Thomas-Danguin et al., 2003)]

Ce test est composé de 16 séries de 4 flacons. Au sein de chaque série, un seul flacon parmi les 4 contient un composé odorant. Chaque bloc est identifié par un numéro (1 à 16) et chaque flacon dans une série par une lettre (A à D). Ce test est divisé en deux tâches, chacune ayant son propre questionnaire (annexe 2).

La première tâche est une épreuve de détection. Elle consiste pour le sujet à retrouver le flacon odorant parmi les 4 dans chacune des séries. La seconde tâche est une épreuve d'identification de l'odeur détectée lors de la tâche de détection. Pour cela, 4 termes sont proposés pour chacune des séries et le sujet doit sélectionner le terme décrivant le mieux l'odeur perçue. Les 16 odeurs utilisées dans le test sont : vanille, clou de girofle, pomme, eucalyptus, cannelle, fioul, pin, ail, herbe coupée, anis, orange, poisson, rose, thym, citron et menthe. Ce test dure environ 20 min. Le nombre de réponses correctes à chacune des tâches est comptabilisé pour former un score global au test. Si le sujet a bien trouvé le flacon odorant parmi les 4, il reçoit un point et s'il a correctement identifié l'odeur, il reçoit un deuxième

point. A la fin du test, la somme des points acquis par chaque sujet est comptabilisée et le score maximum est de 32. Plus ce score est important, plus le sujet a de bonnes capacités olfactives. Sur l'ensemble des participants, le score moyen pour ce test était de 28,3. Après ce test, un seul sujet a été écarté dans la mesure où son score total de 9 laissait penser qu'il souffrait d'hyposmie.

II.1.2 Test II : test de Bourdon

Ce test permet d'évaluer les aptitudes de concentration mentale des candidats, mais aussi de compréhension et de respect des consignes. Il consiste en une épreuve de discrimination visuelle répétitive chronométrée.

Une feuille au format A3 est distribuée au sujet, cette feuille contient un certain nombre de figures formées par des points noirs rassemblés soit en groupe de 3 points, soit en groupe de 4 points ou en groupe de 5 points (annexe 3) (Lesschaeve and Issanchou, 1996). La tâche consiste pour le juge à identifier et barrer d'un trait tous les groupes de 4 points se trouvant sur une même ligne. Toutes les 8 secondes, un chronomètre émet un signal sonore indiquant au sujet qu'il doit marquer l'endroit où il se trouve dans la ligne et passer à la ligne suivante (même si la ligne n'est pas terminée). Il y a au total 50 lignes et chaque ligne contient 8 groupe de 4 points Ce test dure environ 10 min. Pour chaque groupe de 4 points trouvé, le juge reçoit un point. Le score moyen du test était de 239. Après ce test, six sujets ont été écartés car leur score était inférieur à 180.

II.1.3 Test III : capacité à décrire une odeur

Ce test permet d'évaluer la capacité des candidats à décrire verbalement une odeur avec un vocabulaire relativement riche et précis. Pour cela, le candidat doit sentir l'odeur des 3 molécules de notre étude (Oct, Cit, Méth ; Tableau 1, Chapitre I). Les odeurs sont présentées dans des flacons bruns de 50 ml contenant 4 mouillettes de type parfumerie (H. Granger-Veyron, Privas, France) d'une longueur égale à environ 4 cm sur lesquelles ont été déposés 20 μ L d'une solution contenant l'un des odorants. Chaque composé odorant a été présenté à une concentration de 10^{-3} ppm dans de l'huile minérale inodore (n° CAS 8042-47-5, Sigma Aldrich, France). Un prétest a été réalisé avec des personnes du laboratoire de manière à déterminer la concentration optimale des odorants pour ce test.

Le candidat doit sentir les flacons un par un et décrire librement l'odeur qu'il perçoit. Un score pour le test est évalué en fonction du nombre de termes différents employés (richesse de vocabulaire) et de la proximité de ces termes par rapport aux termes attendus (précision du vocabulaire). Pour cette évaluation, les termes hédoniques sont exclus. Ce test dure environ 10 min. Le nombre maximum de points était de 9 (Le Berre et al., 2007). Sur l'ensemble des participants, le score moyen pour ce test était de 4. Après ce test, dix sujets ont été écartés car leur score était inférieur à 1.

II.1.4 Test IV : capacité à évaluer l'intensité odorante sur une échelle linéaire

Ce test a pour objectif d'évaluer si les candidats sont aptes à utiliser une échelle linéaire non structurée pour évaluer des intensités odorantes. Dans ce test, un sujet doit évaluer l'intensité de 8 solutions de 1-butanol (n° CAS : 71-36-3 ; Sigma Aldrich, France) contenant des concentrations de 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 ou 1600 ppm (v/v). Chaque solution est réalisée dans l'eau déminéralisée (MilliQ, Millipore, France). Trente ml de solution sont placés dans un flacon brun de 250 ml. Les flacons sont identifiés avec un code à trois chiffres. Le sujet doit sentir l'odeur des 8 flacons présentés un par un et traduire l'intensité de l'odeur sur une échelle linéaire de 10 cm allant de « odeur très faible » à « odeur très forte » (Figure 18). L'ordre de présentation des flacons était aléatoire et le même pour tous les sujets. Ce test dure environ 10 min. Pour établir le score, on calcule le coefficient de corrélation entre les intensités attendues et les intensités données par le sujet. Plus le coefficient de corrélation est proche de 1, plus les résultats sont proches de l'évaluation exacte. Le score moyen pour ce test était de 0,53.

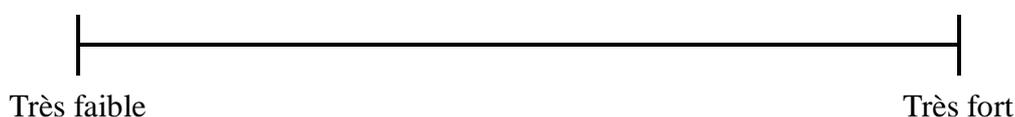


Figure 18 : Echelle linéaire non structurée utilisée par les participants pour l'évaluation de l'intensité des huit concentrations de 1-butanol proposée dans le test des capacités à évaluer l'intensité odorante sur une échelle linéaire (phase de sélection).

II.1.5 Test V : capacité à classer des odeurs d'intensité croissante

L'objectif de ce test est de vérifier si les sujets sont capables de classer correctement des odeurs par ordre d'intensité croissante. Pour cela, les candidats ont été amenés à classer 8 solutions de 1-butanol (But) contenant les mêmes concentrations que celles utilisées dans le test IV. Chaque solution (30 ml) est contenue dans un flacon brun de 250 ml. Chaque flacon était identifié par un code à trois chiffres. Les sujets sentaient librement les flacons codés et les classaient par ordre d'intensité croissante. Une fois le classement terminé, ils consignaient leurs réponses sur une feuille en écrivant les codes des flacons sur une échelle (Figure 19). Ce test dure environ 10 min. La somme des écarts en valeur absolue entre la position du flacon donnée par le sujet et la position correcte est calculée. Plus la somme des écarts est importante, plus les résultats sont éloignés du classement exact. Le score moyen pour ce test était de 7,47.

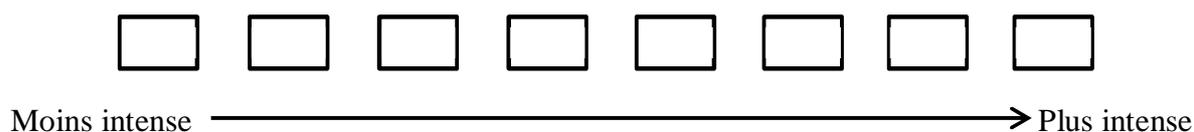


Figure 19 : Echelle utilisée par les participants pour consigner le résultat de leur classement des huit concentrations de 1-butanol dans le test des capacités à classer des odeurs d'intensité croissante (phase de sélection).

II.1.6 Constitution du panel final

Les résultats de l'ensemble des tests de sélection obtenus pour chaque juge ont été ordonnés et les sujets non-exclus sur la base d'un des tests et ayant obtenu les scores les plus élevés ont été sélectionnés. Dix-neuf juges (6 hommes et 13 femmes) âgés de 19 à 60 ans ont été sélectionnés pour la suite de l'étude. Les panélistes sélectionnés signaient en début d'étude un consentement éclairé sans être informés du but des expérimentations. Ils recevaient une compensation de 10 €/heure de participation. Ils ont d'abord participé à 2 séances d'entraînement de 1h chacune afin de se familiariser avec les appareillages et les procédures d'évaluation sensorielle mises en œuvre. Ils ont ensuite participé à 6 séances de mesure d'une durée de 1h30.

II.2 Odeurs

II.2.1 Olfactomètre

Les stimuli odorants ont été délivrés à l'aide d'un olfactomètre à dilution dynamique multicanaux (OM4b, Burghart Medical Technology, Allemagne), piloté par un ordinateur. Dans cet appareillage, des solutions d'odorants (Oct, Cit Méth et But) sont introduites dans les cuves en verre (Figure 20). Les cuves sont traversées par un flux d'air sec et inodore dont le débit est contrôlé par des débitmètres massiques. Les différents odorants sont mélangés en phase gazeuse et dilués dans un courant d'air humidifié. Le mélange a lieu quelques millisecondes seulement avant d'être délivré au sujet par le port olfactif de l'olfactomètre (Figure 20). De l'air humidifié à débit constant (5L/min) est délivré en permanence. Cet air est remplacé par de l'air odorisé (même débit 5L/min) lors des stimulations. Les débits à la sortie de l'olfactomètre ont été vérifiés par un débitmètre à bulle lors d'une phase initiale de calibration et au début de chaque séance. L'olfactomètre est piloté par un logiciel informatique qui permet d'ajuster les débits dans les différentes cuves mais aussi de réaliser des mélanges binaires (utilisation de deux cuves odorantes simultanément) ou de délivrer des odorants seuls. La durée de stimulation pendant laquelle l'air odorisé est délivré au niveau du port olfactif a été fixée à 6 secondes. Le délai entre chaque stimulation était aléatoire entre 30 et 35 secondes. Les temps de stimulation et les temps inter-stimulations sont gérés par l'olfactomètre et l'ordinateur selon une séquence préalablement établie par l'expérimentateur. Les sujets étaient isolés dans une cabine balayée par un courant d'air désodorisé et avertis de l'arrivée d'une odeur par un témoin lumineux qui s'éclairait pendant toute la durée de la stimulation.

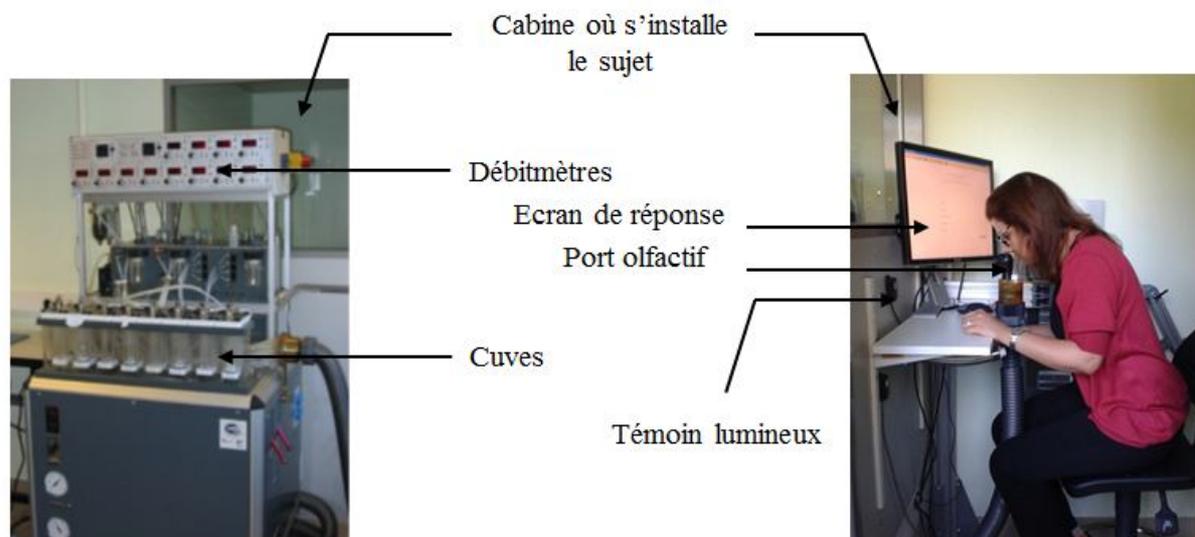


Figure 20 : Vue de l'olfactomètre et du port olfactif et de la cabine où s'installe le sujet

II.2.2 Stimuli

Dans le cas de notre expérience, les solutions d'aldéhydes placées dans les cuves de l'olfactomètre ont été diluées dans de l'huile minérale inodore. L'Oct a été dilué à 10% (v/v) dans l'huile, le Cit à 1% et le Méth à 0,0001% (Tableau 1, chapitre I). Le butanol (But) est placé pur dans la cuve. Pour éviter tout épuisement des solutions dans les cuves de l'olfactomètre, celles-ci ont été renouvelées entre chaque sujet.

Les intensités des odorants à la sortie de l'olfactomètre ont été établies préalablement à l'expérience avec l'aide d'un jury interne au laboratoire (9 personnes). Ces intensités odorantes, correspondant à des concentrations en composés odorants déterminées par les débits appliqués, ont été ajustées pour représenter 4 niveaux distincts (faible, moyennement faible, moyennement fort et fort) pour chacun des 3 odorants (Oct, Cit et Méth). Pour chaque couple d'odorants étudié, 4 concentrations de chacun des deux composés (Oct₁ à Oct₄, Cit₁ à Cit₄, Méth₁ à Méth₄), 16 mélanges binaires (Oct + Cit ou Oct + Méth) et un blanc (air non odorisé) ont été évalués, soit un total de 25 stimuli pour un mélange donné.

Concernant le 1-butanol, il a été nécessaire de définir la plage des concentrations en fonction de l'échelle de référence décrite ci-après (6 niveaux d'intensité de nulle à forte) afin qu'elle couvre la gamme d'intensités de nos stimuli.

II.3 Procédure expérimentale

II.3.1 Séances d'entraînement

Deux séances d'entraînement ont permis aux juges du panel de se familiariser avec l'olfactomètre et avec les procédures sensorielles, notamment celle relative à la mesure de l'intensité.

La première étape de la première séance d'entraînement a consisté en l'évaluation de l'intensité de 6 échantillons d'odeur de 1-butanol correspondant aux niveaux de référence (échelons : niveaux 0, 2, 4, 6, 8, 10) de l'échelle de 1-butanol. Les odeurs sont délivrées par l'olfactomètre. Les juges évaluaient l'intensité odorante selon la méthode d'estimation de la grandeur (magnitude estimation) (Baird et al., 1996) reconnue comme ayant des propriétés de ratio. Dans cette procédure, chaque juge doit tout d'abord sentir et mémoriser l'intensité perçue pour l'échantillon de référence (niveau 4) auquel est arbitrairement attribuée la note de 40. Puis les 6 niveaux de l'échelle 1-butanol ont été présentés dans un ordre aléatoire, le juge devait attribuer une valeur à l'intensité perçue proportionnellement à la valeur donnée à la référence. Les réponses des juges sont enregistrées à l'aide du logiciel FIZZ (Biosystème, Couternon, France). Les résultats obtenus montrent que l'échelle de 1-butanol respecte bien les propriétés attendues (doublement des valeurs d'intensité entre 2 échelons consécutifs) jusqu'à l'échelon 10 (Tableau 5).

Tableau 5 : Moyennes et Erreur type (ES) des intensités des 6 niveaux de l'échelle 1-butanol. Les intensités ont été évaluées par 19 juges selon la méthode d'estimation de la grandeur durant la phase d'entraînement.

échelons	0	2	4	6	8	10
moyenne	7,5	10,7	23,2	41,5	74,1	94,7
± ES	1,0	1,6	3,8	3,5	2,3	2,1

La seconde étape de la première séance d'entraînement a consisté en la mémorisation des échelons de l'échelle de 1-butanol et donc à entraîner les juges à utiliser cette échelle. Pour cela, les stimuli correspondant aux 6 niveaux de l'échelle (0-2-4-6-8-10) ont été présentés aux juges à l'aide de l'olfactomètre. Les niveaux sont tout d'abord présentés dans l'ordre des intensités odorantes croissantes. A chaque odeur, les juges devaient tracer un trait sur une échelle graphique (Figure 21) par-dessus chaque repère (chiffre) correspondant à l'intensité de l'odeur représentant chaque échelon. Cette étape a été répétée 3 fois. Puis les 6 niveaux d'intensité d'odeur de 1-butanol ont été présentés à nouveau mais dans un ordre aléatoire et le juge devait évaluer l'intensité en traçant un trait sur l'échelle graphique, correspondant au niveau d'intensité qu'il pensait recevoir. Si la réponse était incorrecte, l'expérimentateur corrigeait et l'odeur était sentie à nouveau. Chaque niveau a été présenté 3 fois dans cette étape.

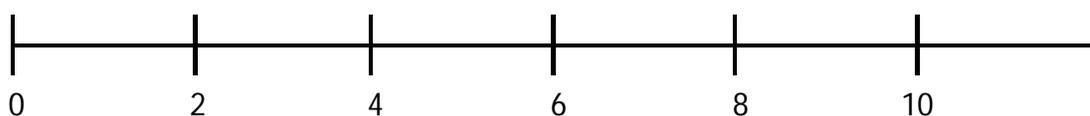


Figure 21 : Echelle linéaire structurée correspondant à l'échelle perceptuelle de 1-butanol (6 échelons : 0-2-4-6-8-10).

Cette échelle a été utilisée par les participants pour reporter les intensités perçues des stimuli lors des phases d'entraînement et lors des séances de mesure.

Au cours de la seconde séance d'entraînement, les juges devaient tout d'abord sentir les 6 niveaux de référence (0-2-4-6-8-10) de l'échelle de 1-butanol, présentés en ordre d'intensité croissante, et placer systématiquement un trait sur l'échelle graphique au niveau de l'échelon correspondant (phase de remise en mémoire de l'échelle). Dans une seconde partie de la séance, chaque juge était amené à évaluer 11 niveaux d'intensité de l'odeur de 1-butanol correspondant aux échelons de l'échelle et aux niveaux intermédiaires (0-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10). Les 11 niveaux étaient présentés de façon aléatoire et les juges devaient évaluer l'intensité perçue de chaque niveau en faisant un trait sur l'échelle graphique (Figure 21) à l'endroit où ils situaient l'intensité odorante perçue par rapport à la gamme de référence apprise

II.3.2 Séances de mesures

Les mesures ont été réalisées au cours de 6 séances de 1h30 soit 3 séances par couple d'odorants : une séance était dédiée à la mesure du caractère hédonique, la suivante à la mesure de l'intensité, et la dernière à la mesure de la qualité de l'odeur des stimuli. Au cours de chaque séance, chaque juge a évalué trois séries de 25 stimulations odorantes, à savoir 4 niveaux d'intensité par odorant, 16 mélanges binaires possibles et le blanc selon trois répétitions pour un total de 75 stimuli par séance. Après 25 stimulations (soit environ 15 min de test), les sujets disposaient de 3 min de pause. L'ordre de présentation de chacun des stimuli était contrebalancé d'un individu à l'autre dans une répétition selon un carré latin de Williams généré à l'aide du logiciel FIZZ et transformé en séquence de stimulation pour l'olfactomètre.

Pour un couple d'odorants, la première séance consistait en la mesure hédonique des 75 stimuli. Les participants devaient évaluer le caractère agréable/désagréable des stimuli et reporter leur perception sur une échelle linéaire non structurée et bornée aux extrémités par les descripteurs « désagréable » et « très agréable » (Figure 22). Cette échelle était présentée sur un écran d'ordinateur situé face au sujet (Figure 20) et générée par le logiciel FIZZ. Les sujets consignaient leur réponse à l'aide de la souris en marquant un trait sur l'échelle.

Désagréable

Très agréable

Figure 22 : Echelle linéaire non structurée utilisée par les participants pour évaluer le caractère hédonique des stimuli lors des séances de mesure.

La seconde séance de test pour un couple d'odorants consistait en la mesure de l'intensité de l'odeur. L'intensité a été évaluée pour les 75 stimuli à l'aide de l'échelle de 1-butanol avec laquelle ils avaient été entraînés. Ils consignaient leurs réponses via l'interface informatique sur l'échelle d'intensité (Figure 21). Au début de la séance, les 6 échantillons (0-2-4-6-8-10) correspondant aux échelons d'intensité de l'échelle de 1-butanol étaient présentés, en ordre croissant, aux sujets pour qu'ils puissent se remémorer les repères perceptifs de cette échelle.

Pour un couple d'odorants, la troisième et dernière séance était consacrée à la mesure de la qualité de l'odeur des 75 stimuli. A chaque stimulus délivré par l'olfactomètre selon le plan de présentation préétabli, les sujets devaient identifier la ou les qualité(s) d'odeur perceptibles. Pour cela, les juges devaient choisir entre cinq propositions indiquées sur l'écran face à eux (logiciel FIZZ). Pour le mélange Oct + Cit, les 5 alternatives étaient : odeur d'herbe, odeur de citronnelle, odeurs d'herbe et de citronnelle, aucune odeur ou une autre odeur (Figure 23). Pour le mélange Oct + Méth, les alternatives étaient une odeur d'herbe, odeur de bouillon, odeurs d'herbe et de bouillon, aucune odeur ou une autre odeur. Les juges ne devaient choisir qu'une seule alternative pour chaque stimulus. Les descripteurs spécifiques aux odorants ont été définis dans une étude préliminaire (Oct : odeur d'herbe, Cit : odeur de citronnelle, Méth : odeur de bouillon) et validés par les réponses récoltées lors du test III de la phase de sélection. Pour consolider le fait que les sujets associent correctement les descripteurs aux odeurs des molécules seules, une intensité moyenne pour chacune d'elles était présentée en début de séance avec son descripteur et cela plusieurs fois (à la demande des juges) pour assurer une bonne reconnaissance.

Évaluez la qualité de l'odeur en cochant dans la liste ci-dessous la description qui convient le mieux à ce que vous sentez:

- herbe
- citronnelle
- Herbe et citronnelle
- Aucune odeur
- Autre odeur

Figure 23: Exemple de questionnaire pour l'évaluation de la qualité des stimuli lors des séances de mesure (ici cas de la séance relative au mélange Oct + Cit).

II.4 Analyses physicochimiques

L'approche psychophysique que nous avons adoptée pour cette étude nécessite une caractérisation fine des perceptions mais aussi des stimuli. Ainsi, la concentration en molécules odorantes des stimuli, délivrés aux sujets en sortie d'olfactomètre, a été estimée pour chaque stimulus en prélevant un échantillon de phase gazeuse au niveau du port olfactif et en l'analysant chimiquement. Le prélèvement en sortie d'olfactomètre était réalisé à l'aide d'un sac en Téflon d'un volume total de 17 L (Figure 24). En fonction de la concentration en molécules odorantes, la phase gazeuse contenue dans le sac était prélevée soit sous la forme d'un échantillon avec une seringue de 1ml soit par adsorption et concentration à l'aide d'un piège constitué d'un polymère absorbant (Tenax) placé dans un tube en verre (Figure 24).



Figure 24 : Piège Tenax (à gauche) et sac Téflon (à droite) utilisés pour l'analyse des stimuli contenant du Méth délivrés par l'olfactomètre (le Méth est une molécule très peu concentrée en phase gazeuse).

La méthode de prélèvement par adsorption sur piège Tenax, permet de piéger et donc de concentrer les molécules contenues dans des volumes importants de phase gazeuse (ici la totalité de la phase gazeuse contenue dans un sac Téflon). Cette méthode permet donc de doser de faibles concentrations ; elle a été mise en œuvre pour analyser les concentrations en Méth dans les stimuli. Cette technique de piégeage consiste à faire passer un volume connu de gaz au travers du piège constitué d'un tube en verre (longueur: 15,25 cm, diamètre extérieur: 6 mm, diamètre intérieur: 3 mm) rempli d'un adsorbant (Tenax : polymère de 2,6-diphényl-p-phénylène oxyde, hydrophobe et poreux). Le polymère adsorbe les composés chimiques contenus dans le gaz qui le traverse. Le piège Tenax est raccordé au robinet du sac Téflon à l'aide d'un tube en Téflon. L'autre extrémité du piège est raccordée à une pompe. Une vanne fine entre la pompe et le piège permet d'ajuster préalablement le débit d'aspiration. La Figure 25 schématise le principe du prélèvement sur Tenax.

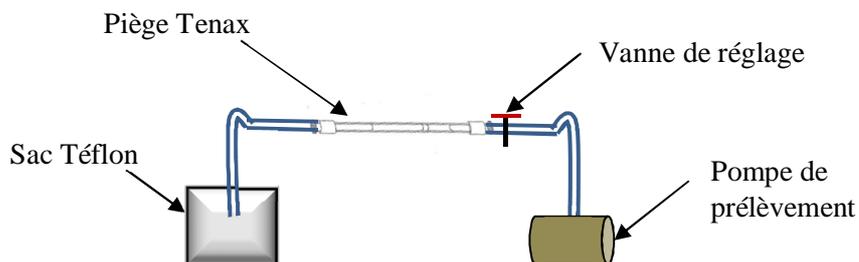


Figure 25: Principe du prélèvement sur piège Tenax permettant une pré-concentration des molécules odorantes avant analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Pour effectuer l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG) des molécules adsorbées sur un piège Tenax (Méth), celui-ci est placé dans un injecteur TDS (ThermoDesorption System, Gerstel, Pays Bas). L'injection dans la colonne de CPG (Agilent Technologie, France) comprend trois phases. Tout d'abord le piège silice du TDS, constitué d'un capillaire en silice, est refroidi jusqu'à -130°C par de l'azote liquide. Quand cette température est atteinte, le piège Tenax est placé dans l'enceinte de chauffage du TCT qui est connecté au piège froid. Le tube Tenax est alors chauffé à 250°C en quelques minutes ($12^{\circ}\text{C}/\text{seconde}$) et maintenu à cette température pendant 30 minutes. Cette phase de chauffage permet aux molécules piégées sur le Tenax de se volatiliser et d'être entraînées par le gaz vecteur de la CPG (hydrogène) qui traverse le Tenax en direction du piège froid où elles sont alors piégées dans le piège silice à -130°C . Le débit de désorption est de $25\text{ mL}/\text{min}$. A la fin de la désorption, le piège de silice est très rapidement réchauffé, et passe de 20°C à 280°C en quelques secondes ($60^{\circ}\text{C}/\text{seconde}$) ; les molécules volatiles sont alors volatilisées presque instantanément. Le gaz vecteur traverse le capillaire de silice et entraîne les molécules volatiles vers la colonne chromatographique. C'est la phase d'injection proprement dite.

Dans le cas d'un prélèvement à la seringue, les échantillons prélevés (But, Oct et Cit) dans le sac Téflon sont ensuite analysés par CPG. Le contenu de la seringue est injecté directement dans la CPG au niveau de l'injecteur. Les analyses CPG ont été effectuées sur un chromatographe (Combipal-Thermo Electron Corporation) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire DB-Wax d'une longueur de 30 mètres, de diamètre

intérieur à 0,32 mm, avec une épaisseur de phase stationnaire de 0,5 μm (J&W Scientific, Californie). Le four du chromatographe était programmé selon une rampe de température de 120°C à 240°C (7°C/min). Le gaz vecteur utilisé était de l'hydrogène. Le dosage a été réalisé par étalonnage externe. Celui-ci consiste à déterminer la concentration des différents odorants en comparant la surface du pic chromatographique obtenue pour les échantillons, à la surface mesurée pour des solutions étalons. Les données concernant l'étalonnage ne sont pas présentées ici. La connaissance de la concentration dans l'échantillon analysé et du volume injecté (1 ml pour la seringue ou volume du sac pour le piège Tenax) permet d'estimer la concentration des molécules odorantes en phase gazeuse délivrées au niveau du port olfactif de l'olfactomètre.

II.5 Analyses statistiques des données sensorielles

II.5.1 Réponses quantitatives

Afin d'étudier la perception de l'intensité de l'odeur des mélanges, nous avons utilisé deux types de représentations graphiques. Tout d'abord, nous avons calculé et représenté pour chaque stimulus l'intensité moyenne sur l'ensemble du panel ainsi que l'erreur type sur cette moyenne (ES). Puis nous avons représenté l'intensité moyenne et l'ES uniquement pour les mélanges dans la représentation [$\sigma = f(\tau)$] proposée par Patte et Laffort (1979) (cf Chapitre I). Pour cette représentation, on considère trois valeurs d'intensité : l'intensité perçue pour le mélange (I_{mix}), l'intensité perçue pour l'Oct seul (I_{Oct}) et l'intensité perçue pour le Cit ou pour le Méth (I_{Cit} et $I_{\text{Méth}}$, respectivement). L'intensité perçue du mélange (I_{mix}) est rapportée à la somme des intensités perçues des deux constituants Oct et Cit ($I_{\text{Oct}} + I_{\text{Cit}}$) ; il s'agit du paramètre sigma : $\sigma = I_{\text{mix}} / (I_{\text{Oct}} + I_{\text{Cit}})$. Le paramètre σ est exprimé en fonction du paramètre Tau (τ) qui correspond au rapport entre l'intensité perçue de l'un des constituants (Oct par exemple pour τ_{Oct}) et la somme des intensités de chaque substance perçue hors mélange [ex : $\tau_{\text{Oct}} = I_{\text{Oct}} / (I_{\text{Oct}} + I_{\text{Cit}})$]. Ce paramètre reflète la proportion de l'intensité relative d'une substance odorante. Lorsque $\tau = 0,5$, le mélange est dit iso-intense car il est constitué par les deux odorants à la même intensité ($I_{\text{Oct}} = I_{\text{Cit}}$).

II.5.2 Réponses qualitatives

Afin d'étudier la perception de la qualité de l'odeur des mélanges, les proportions de réponse du panel pour chacun des descripteurs proposés (ou proportion d'identification) sont présentés pour chaque stimulus. Les proportions de réponse pour les descripteurs relatifs à la présence d'une autre odeur ou de l'absence d'odeur n'ont pas été analysées car elles étaient très faibles (< 10 %).

Les proportions de réponses ont ensuite été modélisées sous la forme de probabilités d'identification de manière à mettre en évidence les effets de dominance dans les mélanges (Atanasova et al., 2005a). Pour cela, nous avons choisi d'estimer les probabilités d'identification dans les mélanges (P) de l'odeur d'un seul composé ou bien des deux (par exemple pour le mélange Oct + Cit : P_{herbe} ou $P_{citronnelle}$ ou $P_{mélange}$ pour le descripteur « herbe et citronnelle ») sur la base d'un modèle logistique (méthode GEE) (Zeger et al., 1988). Selon ce modèle, le *logit* de la probabilité de réponse dépend de la proportion d'intensité d'un composé dans le mélange (τ) et du sujet (Atanasova et al., 2005a). On peut ainsi estimer une probabilité de réponse pour chacun des descripteurs considérés (équations 1 et 2). Dans le cas du descripteur relatif à la présence des deux odeurs des constituants dans le mélange, on considère que la relation est de type quadratique et donc dépend de τ^2 (équation 3).

Equations : Dans le cas du mélange Oct + Cit, modèle d'estimation de la probabilité d'identification dans les mélanges de l'odeur « herbe » seule [1] ; de l'odeur « citronnelle » seule [2] ; de la présence des deux odeurs [3].

$$\text{logit}(P_{herbe}) = \log\left(\frac{P_{herbe}}{1-P_{herbe}}\right) = \mu + \alpha_{sujet} + \beta(\tau - 0,5) \quad [1]$$

$$\text{logit}(P_{citronnelle}) = \log\left(\frac{P_{citronnelle}}{1-P_{citronnelle}}\right) = \mu' + \alpha'_{sujet} + \beta'(\tau - 0,5) \quad [2]$$

$$\text{logit}(P_{mélange}) = \log\left(\frac{P_{mélange}}{1-P_{mélange}}\right) = \mu'' + \beta''(\tau - 0,5) + \gamma''(\tau - 0,5)^2 \quad [3]$$

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), version 8.1. Le modèle logistique (GEE) a été ajusté à l'aide de la procédure GENMOD de SAS.

II.5.3 Réponses hédoniques

Afin d'étudier l'influence du niveau de concentration de chacun des odorants sur l'appréciation hédonique des odorants seuls et de leurs mélanges, nous avons calculé pour chaque stimulus la valeur moyenne du caractère hédonique sur l'ensemble du panel ainsi que l'erreur type sur cette moyenne (ES). Puis nous avons représenté cette moyenne pour chaque stimulus, mais aussi en fonction de l'intensité du stimulus et en fonction de τ_{Octanal} . Les coefficients de corrélation (pearson) ainsi les probabilités associées ont été calculé. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC), version 8.1.

III. Résultats

III.1 Analyses physicochimiques

Afin d'assurer une quantification en CPG et ainsi estimer la concentration des composés odorants à la sortie du port olfactif de l'olfactomètre, des droites d'étalonnage des quatre composés odorants choisis ont été établies. Les résultats obtenues (non détaillés ici) montrent que chaque étalonnage est linéaire (coefficients de détermination $R^2 > 0.97$). Les droites d'étalonnage ont été utilisées pour calculer, pour chaque stimulus, les concentrations réelles de chaque odorant à chaque niveau de concentration utilisé (Tableau 6).

Tableau 6 : Concentrations des stimuli, Butanol (But), Octanal (Oct), Citronellal et Méthional (Méth), à la sortie de l'olfactomètre.

Les concentrations moyennes et l'erreur type associée (ES) ont été estimées sur la base d'un échantillonnage de la phase gazeuse en sortie d'olfactomètre puis analysés par chromatographie en phase gazeuse ; elles sont exprimées en ppm (10^{-6} v/v) de phase gazeuse. Pour certains stimuli, la mesure n'a été faite qu'une seule fois (pas d'ES dans ces cas).

Molécule odorante	Concentration (ppm)	\pm ES
But 2	0,16	0,006
But 4	0,92	
But 6	4,36	0,13
But 8	37,56	0,53
But 10	137,77	2,52
Oct 1	0,55	
Oct 2	1,20	
Oct 3	2,62	
Oct 4	6,09	0,063
Cit 1	0,0002	
Cit 2	0,0010	
Cit 3	0,0305	
Cit 4	0,42	0,040
Méth 1	0,000035	
Méth 2	0,0012	
Méth 3	0,0058	
Méth 4	0,0193	0,0004

III.2 Intensité odorante

Mélange Octanal + Citronellal

L'intensité perçue pour les odeurs d'Oct et de Cit et de leurs mélanges est présentée dans la Figure 26. Les juges perçoivent les deux molécules de manière dose-dépendante. A faible concentration, l'Oct est plus intense que le Cit. A forte concentration, les deux molécules sont perçues selon des intensités proches. Lorsque l'Oct est en mélange avec le Cit, l'intensité perçue est inférieure à la somme des intensités des odorants seuls. Lorsqu'on compare l'intensité perçue pour les mélanges à celles générées par leurs constituants, on observe qu'à faible concentration d'Oct et de Cit (Oct1 Cit1, Oct1 Cit2, Oct1 Cit3, Oct2 Cit2), l'intensité de ces mélanges est supérieure ou égale à celle de l'Oct. A faible concentration d'Oct et forte concentration de Cit (Oct1 Cit3, Oct1 Cit4, Oct2 Cit3, Oct2 Cit4), l'intensité du mélange est proche à celle du Cit. A forte concentration d'Oct, l'intensité du mélange est égale à celle de l'Oct (Figure 26; histogrammes roses et gris).

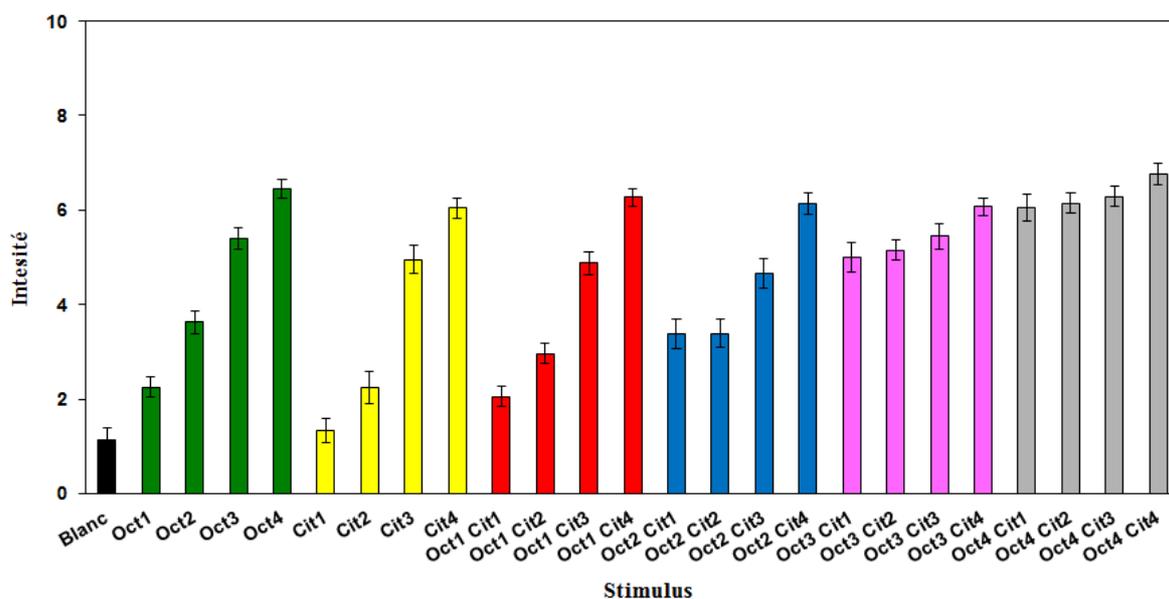


Figure 26: Intensité perçue pour les odeurs d'Octanal (Oct), de Citronellal et de leurs mélanges.

Les valeurs représentent la moyenne \pm ES des réponses de 19 juges. Histogrammes verts : Oct seul, histogrammes jaunes : Cit seul, histogrammes rouges : Cit+Oct1, histogrammes bleus : Cit + Oct2, histogrammes roses : Cit + Oct3, histogrammes gris : Cit + Oct4.

Afin d'évaluer les effets sensoriels induits par les mélanges par rapport à leurs composantes séparées, les résultats expérimentaux pour le panel ont été présentés en utilisant la représentation de Patte et Lafort (1979) (Figure 27).

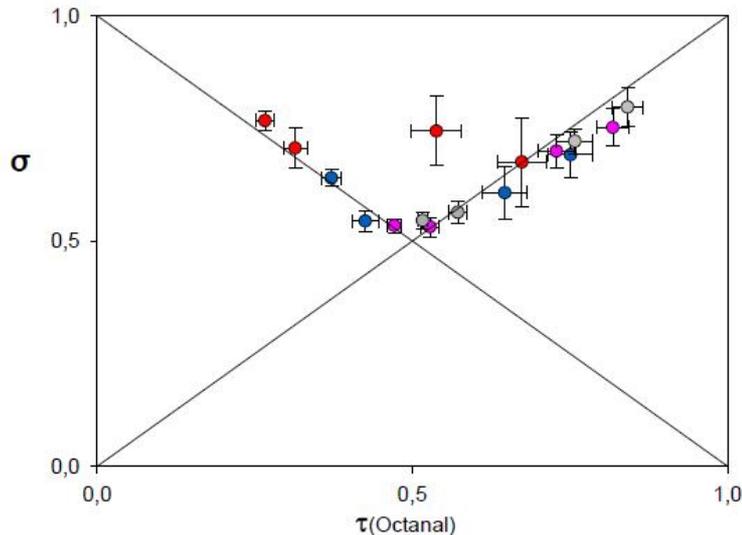


Figure 27 : Intensité perçue pour les mélanges Oct + Cit selon la représentation $\sigma = f(\tau)$. $\sigma = I_{(\text{Oct}+\text{Cit})} / (I_{\text{Oct}} + I_{\text{Cit}})$ et $\tau_{\text{Oct}} = I_{\text{Oct}} / (I_{\text{Oct}} + I_{\text{Cit}})$.

Les résultats représentent les moyennes d'intensité pour le panel (\pm ES ; $n=19$). Rouge : Cit+Oct1, bleu : Cit + Oct2, rose : Cit + Oct3, gris : Cit + Oct4.

Globalement, les résultats obtenus avec le mélange Oct + Cit montrent une compression de l'intensité dans les mélanges qui s'apparente à un effet d'hypo-addition ($\sigma < 1$) (Figure 27). Les effets induits par les mélanges sont strictement dépendants des ratios perceptifs des composés mélangés. Ceci se traduit par le fait qu'à une valeur donnée de τ correspond une valeur de σ (Figure 27). On observe de manière générale que l'intensité du mélange suit la règle de la plus forte composante, c'est-à-dire que l'intensité perçue pour le mélange correspond à l'intensité de la composante la plus intense. À $\tau_{\text{Oct}} < 0,5$, c'est-à-dire les mélanges pour lesquels la proportion d'intensité de l'odeur de Oct est inférieure à celle du Cit, l'intensité du mélange est plus proche voire égale à l'intensité du Cit seul. À $\tau_{\text{Oct}} > 0,5$, c'est l'inverse : l'intensité du mélange est plus proche voire égale à l'intensité de l'Oct seul. Seul le mélange Oct1 Cit2, formé d'intensités équivalentes et plutôt faibles des deux odeurs ($\tau \sim 0,5$), induit une intensité supérieure à celles de leurs constituants ce qui s'apparente à un effet d'addition partielle.

Mélange Octanal + Méthional

L'intensité perçue pour les odeurs d'Oct et de Méth et de leurs mélanges est présentée dans la Figure 28. Les juges perçoivent les deux molécules de manière dose-dépendante. A faible concentration, les deux molécules sont perçues à la même intensité. A forte concentration, l'Oct est plus intense que le Méth. Lorsque l'Oct est en mélange avec le Méth l'intensité perçue est inférieure à la somme des intensités des odorants seuls. Lorsque l'on compare l'intensité perçue pour les mélanges à celles générées par leurs constituants, on observe qu'à faible concentration d'Oct, l'intensité du mélange est supérieure à celles des constituants sauf le mélange Oct2 Méth 3 ; l'intensité de ce mélange est intermédiaire entre celle des odorants seuls. Cependant, à forte concentration d'Oct, l'intensité du mélange est supérieure voire égale à celle de l'Oct (histogrammes roses et gris).

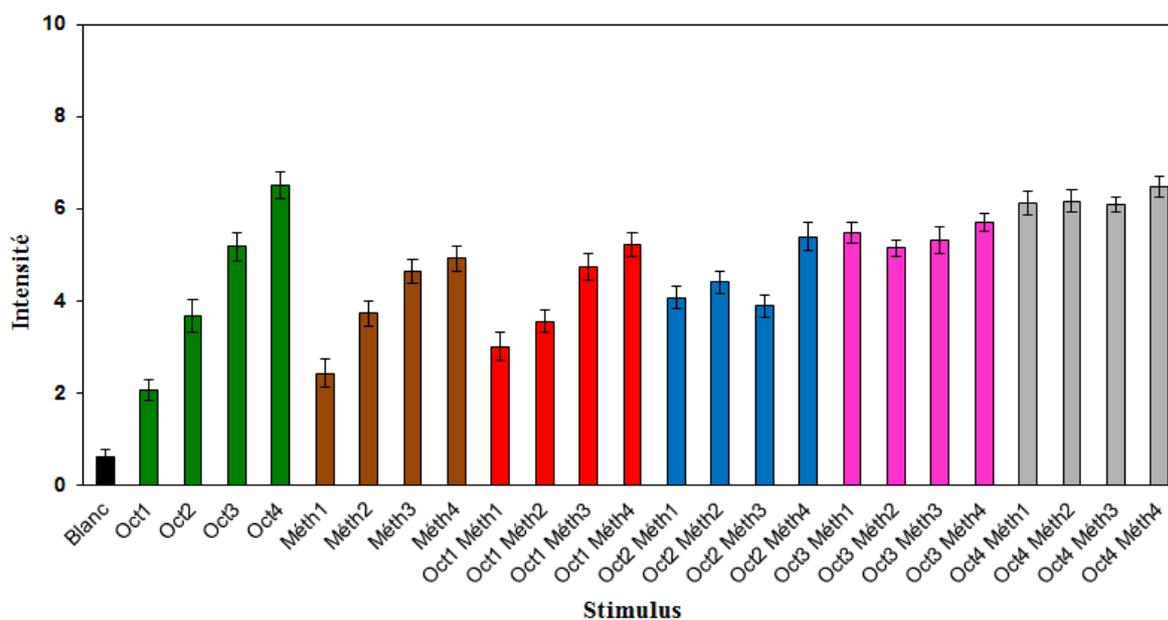


Figure 28 : Intensité perçue pour les odeurs d'Octanal (Oct) et de Méthional (Méth) et de leurs mélanges.

Les valeurs représentent la moyenne \pm ES des réponses de 19 juges. Histogrammes verts : Oct seul, histogrammes bruns : Méth seul, histogrammes rouges : Méth+Oct1, histogrammes bleus : Méth + Oct2, histogrammes roses : Méth + Oct3, histogrammes gris : Méth + Oct4.

De la même façon que pour le mélange Oct + Cit, les résultats expérimentaux pour le panel sont présentés en utilisant la représentation de Patte et Lafort (1979) afin de visualiser les effets sensoriels induits par les mélanges (Figure 29).

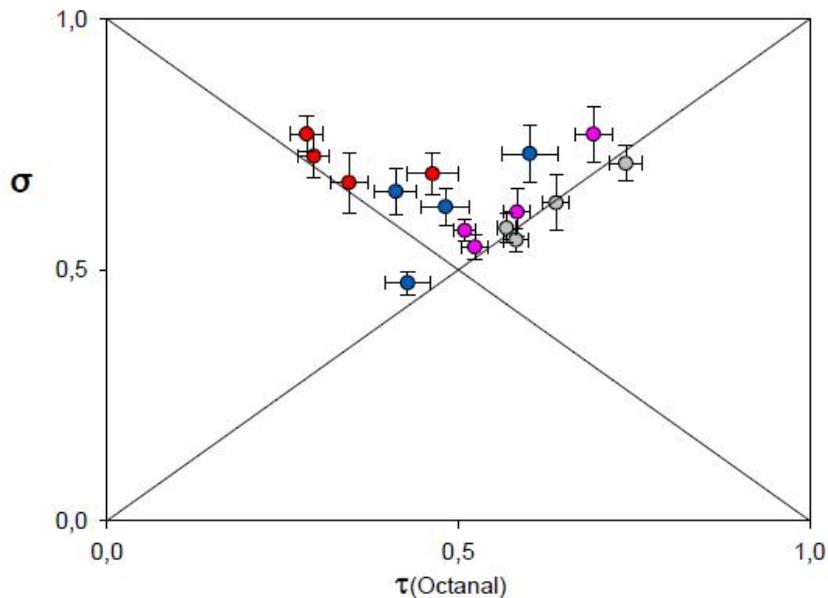


Figure 29: Intensité perçue pour les mélanges Oct + Méth selon la représentation $\sigma = f(\tau)$. $\sigma = I_{(\text{Oct}+\text{Méth})} / (I_{\text{Oct}} + I_{\text{Méth}})$ et $\tau_{\text{Oct}} = I_{\text{Oct}} / (I_{\text{Oct}} + I_{\text{Méth}})$.

Les résultats présentent les moyennes d'intensité pour le panel (\pm ES ; n=19). Rouge : Méth+Oct1, bleu : Méth + Oct2, rose : Méth + Oct3, gris : Méth + Oct4.

L'examen de la Figure 29 fait clairement apparaître que le mélange Oct + Méth induit majoritairement des effets d'addition partielle au niveau perceptif. Les effets des mélanges ne sont pas strictement dépendants du ratio perceptif des composés en mélange car à certaines valeurs de τ peuvent correspondre plusieurs valeurs de σ . Ceci montre que le niveau d'intensité de l'odeur est aussi un facteur important. Ainsi, le mélange Oct2 Méth3 est le seul mélange qui induit un effet de compromis significatif. Pour ce mélange qui correspond à des intensités moyennes des deux composés (Figure 28), l'intensité du mélange est inférieure à celle du Méth seul mais supérieure à celle de l'Oct seul. Par contre, les mélanges Oct2 Méth2 et Oct2 Méth4, qui ont une valeur de τ proche, ne montrent pas cet effet de compromis.

III.3 Qualité odorante

Mélange Octanal + Citronellal

Les descripteurs spécifiques aux odorants utilisés dans cette étude sont d'une part l'odeur d'herbe pour l'Oct et d'autre part l'odeur de citronnelle pour le Cit. Les proportions de réponses liées aux descripteurs « herbe » « citronnelle » et « herbe et citronnelle » sont présentées dans la Figure 30. Ces données montrent que la qualité des odeurs de l'Oct et du Cit a été confondue par les juges. C'est notamment le cas lorsque les juges sont stimulés par les odorants seuls Cit4 mais surtout Oct3 et Oct4 pour lesquels la proportion de réponse « herbe et citronnelle » est presque aussi élevée que celle obtenue pour le descripteur « herbe » attendue pour l'Oct seul (Figure 30).

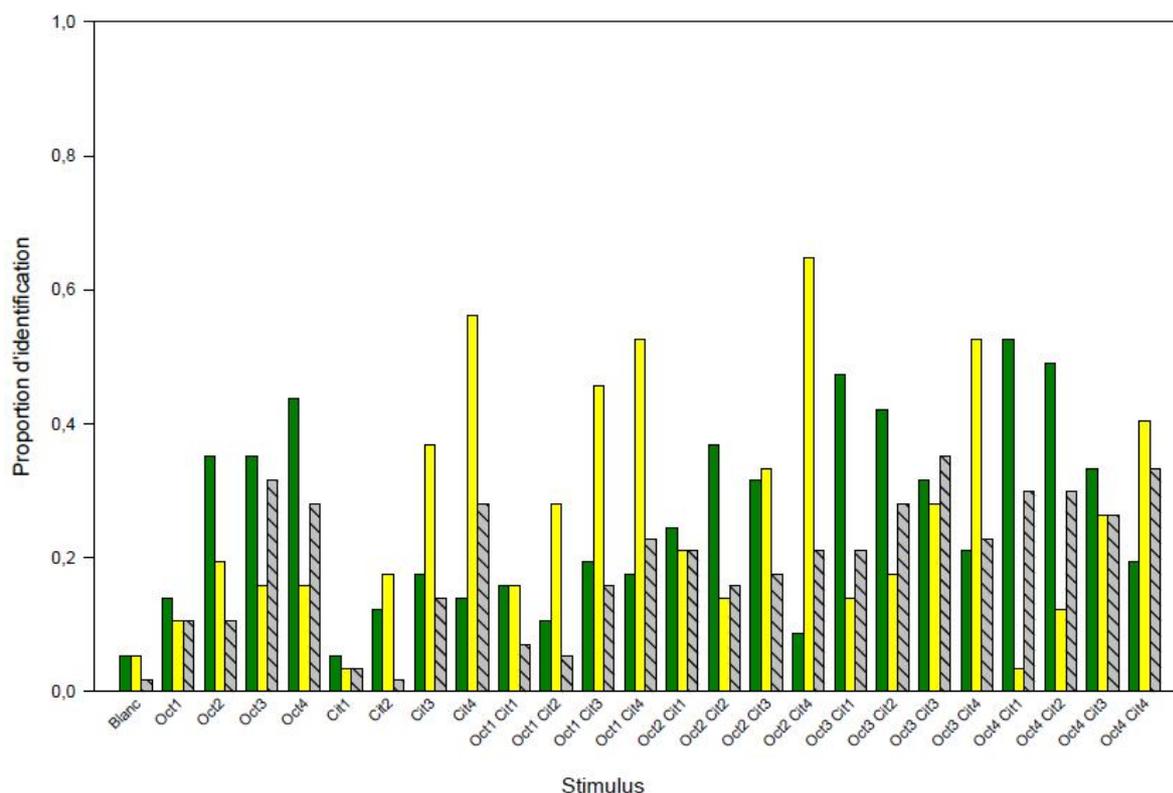


Figure 30: Proportion d'identification des odeurs liées à l'Octanal (Oct) et au Citronellal pour chaque stimulus (odorants seuls et leurs mélanges).

En vert : proportion d'identification de l'odeur « herbe » correspondant à l'Oct. En jaune : proportion d'identification de l'odeur « citronnelle » correspondant au Cit. En gris hachuré : proportion d'identification des deux odeurs simultanément « herbe et citronnelle ».

Les résultats de proportion d'identification ont été modélisés à l'aide d'un modèle logistique pour estimer les probabilités d'identification des qualités odorantes sur toute la gamme des proportions des composés dans le mélange. Les modèles obtenus pour les proportions d'identification des odeurs « herbe » et « citronnelle » sont très significatifs ($p < 0,0001$) ; en revanche, le modèle quadratique obtenu pour les proportions d'identification « herbe et citronnelle » n'est pas significatif ($p > 0,6$). Les données expérimentales de proportions ainsi que les estimations des modèles (P_{herbe} , $P_{\text{citronnelle}}$ et $P_{\text{mélange}}$) en fonction de τ_{Oct} sont représentées sur la Figure 31.

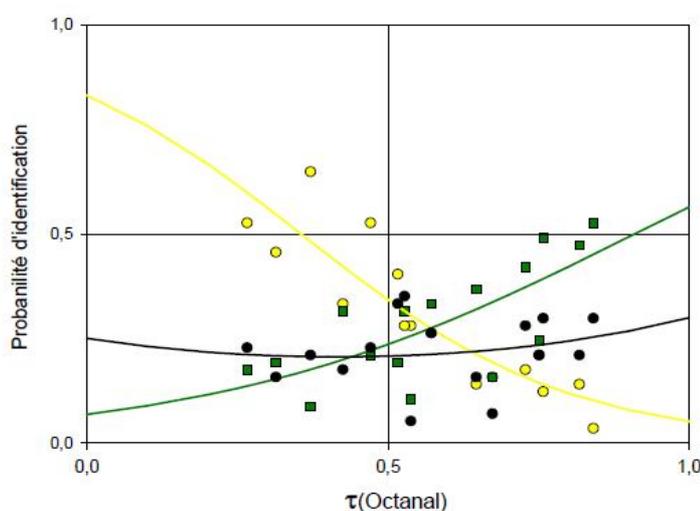


Figure 31 : Proportion d'identification exprimée en fonction de τ_{Octanal} pour le mélange Octanal + Citronnellal.

Les points représentent les proportions de réponses observées pour l'odeur « herbe » (vert), « citronnelle » (jaune) et « herbe et citronnelle » (noir) à l'échelle du panel. Les courbes correspondent aux probabilités d'identification issues de la modélisation par le modèle logistique.

Les résultats de la modélisation des probabilités d'identification des odeurs des composants dans les mélanges Oct + Cit montrent que la probabilité d'identification de l'odeur de citronnelle liée au Cit augmente avec la proportion de Cit dans le mélange (τ_{Oct} diminue ; Figure 31) pour atteindre des valeurs classiques de l'ordre de 0,8 lorsque le Cit est très majoritaire. Ceci n'est pas le cas pour l'odeur d'herbe liée à l'Oct. Pour ce descripteur, la probabilité d'identification augmente avec la proportion d'Oct dans le mélange (τ_{Oct} augmente) mais reste basse, même pour les niveaux élevés d'Oct dans le mélange ($P_{\text{herbe}} <$

0,6 ; Figure 31). Ce résultat reflète vraisemblablement la confusion des deux qualités odorantes par les juges. On peut noter que pour les mélanges iso-intenses ($\tau = 0,5$), la probabilité d'identifier la note herbe est inférieure à la probabilité d'identifier la note citronnelle ($P_{\text{herbe}} < P_{\text{citronnelle}}$ à $\tau = 0,5$; Figure 31), ce qui montre qu'il existe une dominance perceptive de l'odeur de citronnelle du Cit sur l'odeur d'herbe de l'Oct. La modélisation des proportions de réponse « herbe et citronnelle », c'est-à-dire la probabilité d'identifier les deux odeurs dans un mélange, correspond à une constante (courbe noire représentée dans la Figure 31), ce qui illustre que le modèle obtenu n'est pas significatif. Ce résultat reflète aussi la confusion des qualités odorantes des deux odorants.

- **Mélange Octanal + Méthional**

Les descripteurs spécifiques aux odorants utilisés dans cette étude sont l'odeur d'herbe pour l'Oct et l'odeur de bouillon pour le Méth. Les proportions de réponses liées aux descripteurs « herbe », « bouillon » et « herbe et bouillon » sont présentées dans la Figure 32. Ces données montrent que la qualité propre à chacun des deux odorants a été bien différenciée par les juges, sauf pour le stimulus Oct2 qui présente un profil qualitatif assez surprenant sans que l'on puisse avancer de raison précise expliquant ce résultat. Par ailleurs, la proportion de réponse « bouillon » pour le stimulus Blanc est assez élevée ($P_{\text{Bouillon}} > 0,2$; Figure 32), ce qui pourrait laisser penser à une certaine rémanence de cette odeur, mais cela ne semble pas affecter les autres échantillons (notamment les composés purs). Enfin, on peut noter que les mélanges contenant une forte proportion d'Oct (Oct4 Meth_n ; Figure 32) ne laissent identifier que l'odeur d'herbe de l'Oct (sauf pour le mélange Oct4 Meth4).

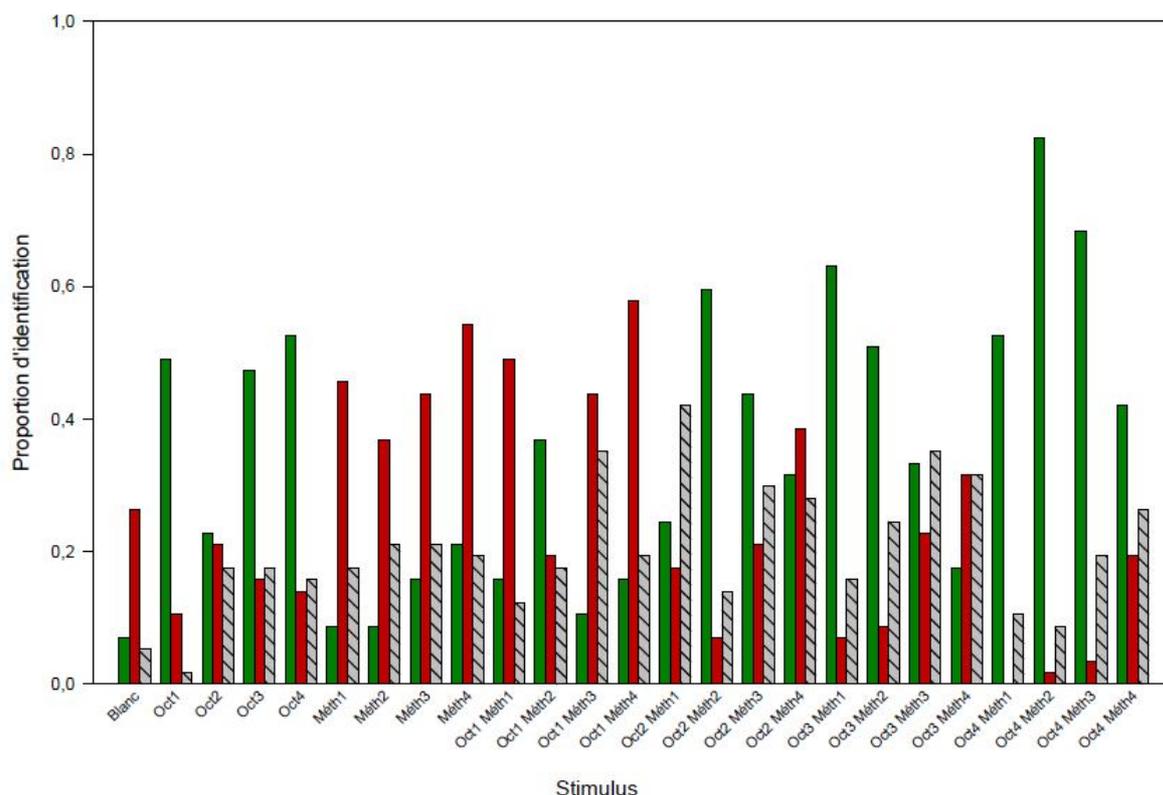


Figure 32: Proportion d'identification des odeurs liées à l'Octanal (Oct), au Méthional (Méth) pour chaque stimulus (odorants seuls et leurs mélanges).

En vert : proportion d'identification de l'odeur « herbe » correspondant à l'Oct. En rouge : proportion d'identification de l'odeur « bouillon » correspondant au Méth. En gris hachuré : proportion d'identification des deux odeurs simultanément « herbe et bouillon ».

Les résultats de proportion d'identification ont été modélisés à l'aide d'un modèle logistique pour estimer les probabilités d'identification des qualités odorantes sur toute la gamme des proportions des composés dans le mélange. Les modèles obtenus pour les proportions d'identification des odeurs « herbe » et « bouillon » sont très significatifs ($p < 0,0001$). De même, le modèle quadratique obtenu pour les proportions d'identification « herbe et bouillon » est significatif ($p < 0,05$). Les données expérimentales de proportions ainsi que les estimations des modèles (P_{herbe} , P_{bouillon} et $P_{\text{mélange}}$) en fonction de τ_{Oct} sont représentées sur la Figure 33.

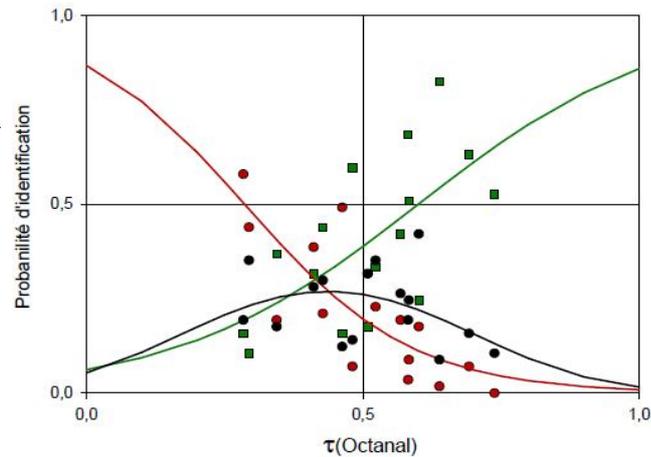


Figure 33: Proportion d'identification exprimée en fonction de $\tau_{(\text{Octanal})}$ pour le mélange Octanal + Méthional.

Les points représentent les proportions de réponses observées pour l'odeur « herbe » (vert), « bouillon » (rouge) et « herbe et bouillon » (noir) à l'échelle du panel. Les courbes correspondent aux probabilités d'identification issues de la modélisation par le modèle logistique.

Les résultats de la modélisation des probabilités d'identification des odeurs des composants dans les mélanges Oct + Méth montrent que les probabilités d'identification des odeurs « herbe » et « bouillon » augmentent respectivement avec la proportion d'Oct et de Méth dans les mélanges pour atteindre des valeurs classiques de l'ordre de 0,8 pour les mélanges très majoritaires en l'un des composés (Figure 33). Il est intéressant de noter qu'à iso-intensité ($\tau = 0,5$), la probabilité moyenne d'identifier la note herbe est largement supérieure à la probabilité moyenne d'identifier la note bouillon ($P_{\text{herbe}} > P_{\text{bouillon}}$ à $\tau = 0,5$; Figure 33), ce qui montre une dominance de l'odeur de l'Oct par rapport au Méth. De plus, on peut noter que la probabilité d'identification de la note « bouillon » du Méth devient très faible ($P_{\text{bouillon}} < 0,15$) lorsque l'Oct devient majoritaire dans le mélange ($\tau > 0,5$; Figure 33). Enfin, la modélisation des proportions de réponse « herbe et bouillon » est bien de type quadratique et montre que la probabilité d'identifier les odeurs des deux odorants dans le mélange est la plus élevée pour les mélanges proches de l'iso-intensité ($\tau \sim 0,5$; Figure 33), ce qui montre que le mélange Oct + Méth est bien de type hétérogène et que les odeurs propres des deux odorants sont bien discriminées par les juges.

III.4 La valence hédonique

- **Mélange Octanal + Citronellal**

L'influence des variations de concentration et des proportions de chacun des composés sur l'appréciation hédonique du mélange Oct + Cit a été évaluée pour les 25 stimuli (composés seuls et mélanges ; Figure 34A). Il apparaît que l'appréciation de l'odeur d'Oct diminue lorsque la concentration en cet odorant augmente. Au contraire, il n'y a pas de variation de l'appréciation hédonique du Cit en fonction de la concentration. L'odeur du Cit est aussi appréciée que l'odeur de l'Oct aux faibles concentrations. Les mélanges contenant des fortes concentrations d'Oct (histogrammes roses et gris) semblent moins appréciés que les mélanges contenant des faibles concentrations d'Oct (histogrammes rouges et bleus).

Afin d'évaluer le lien entre l'intensité des stimuli et leur appréciation, nous avons représenté le caractère hédonique moyen en fonction de l'intensité moyenne perçue de chaque stimulus (Figure 34B). Plus l'intensité perçue augmente, plus l'appréciation hédonique diminue ($r(25) = -0,61$; $p = 0.0011$). Toutefois, pour les fortes intensités, une forte variabilité est observée, suggérant l'influence d'autres paramètres dans l'appréciation hédonique des mélanges notamment.

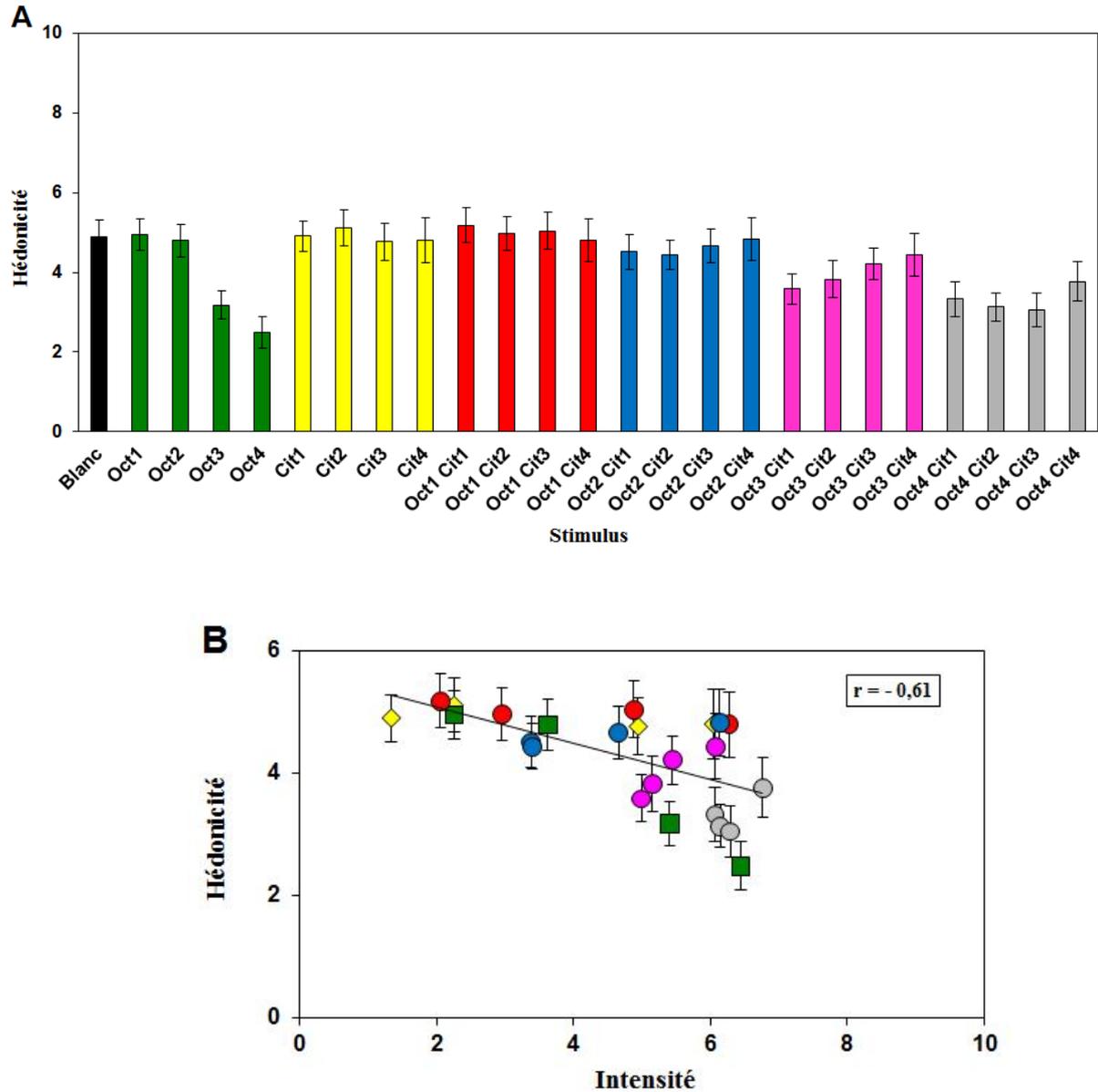


Figure 34: (A) Appréciation hédonique moyenne (\pm ES ; n=19) pour les différentes concentrations d'Octanal (Oct), de Citronellal et de leurs mélanges. (B) Corrélation ente appréciation hédonique moyenne et intensité odorante moyenne pour chacun des 25 stimuli du mélange Oct + Cit.

(r) coefficient de corrélation. Pour les deux figures A et B, le code couleur est le suivant : Vert = Oct seul, jaune = Cit seul, rouge = mélange Cit + Oct1, bleu = Cit + Oct2, rose = Cit + Oct3, gris = Cit + Oct4.

La Figure 35 représente l'évolution du caractère hédonique des mélanges en fonction de la proportion perceptive des odorants (τ_{Oct}). L'augmentation de la proportion d'Oct dans le mélange engendre une diminution linéaire de l'appréciation hédonique ($r(16) = -0,58$; $p = 0,018$) montrant l'importance de la qualité propre de l'Oct dans l'appréciation des mélanges.

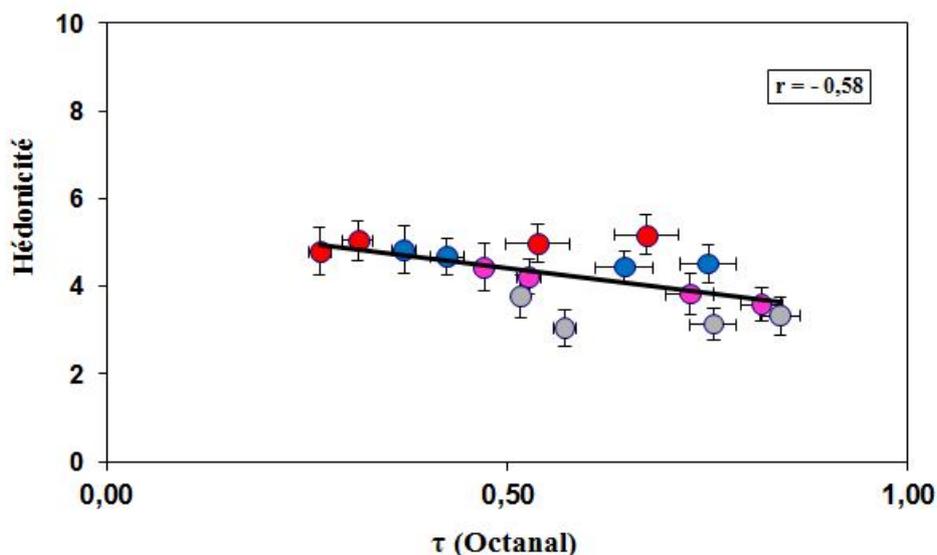


Figure 35: Evolution de l'appréciation hédonique des mélanges Oct + Cit en fonction de la proportion perceptive des odorants dans les mélanges ($\tau_{Octanal}$). Les points représentent des moyennes sur le panel ($\pm ES$; $n=19$).

(r) coefficient de corrélation. Rouge = mélange Cit + Oct1, bleu = Cit + Oct2, rose = Cit + Oct3, gris = Cit + Oct4.

- **Mélange Octanal + Méthional**

L'influence des variations de concentration et des proportions de chacun des composés sur l'appréciation hédonique du mélange Oct + Méth a été évaluée pour les 25 stimuli (composés seuls et mélanges ; Figure 36A). Il apparaît que les odeurs des composés seuls sont moins appréciées lorsque la concentration en odorant augmente. Les profils d'appréciation sont comparables entre les deux odeurs. Globalement, lorsque l'Oct est en mélange avec le Méth, l'appréciation diminue lorsque la concentration augmente. Ainsi, les mélanges à fortes concentration d'Oct et de Méth sont moins appréciés que les mélanges à faible concentration.

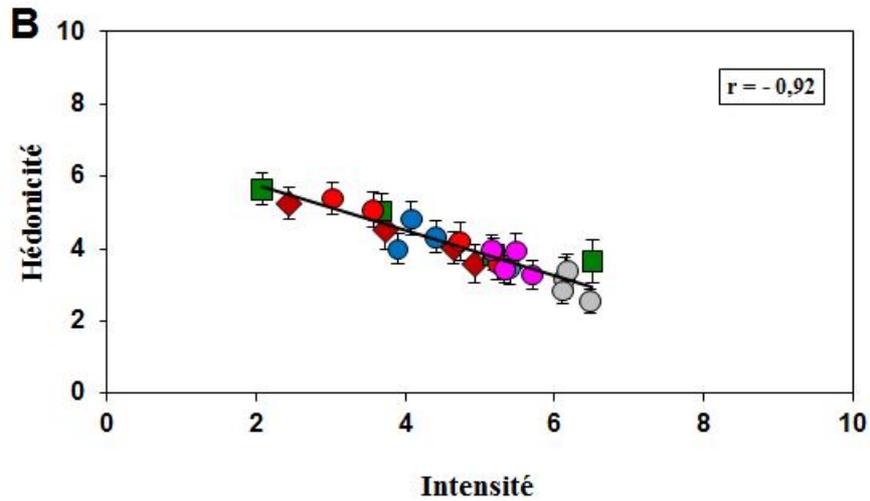
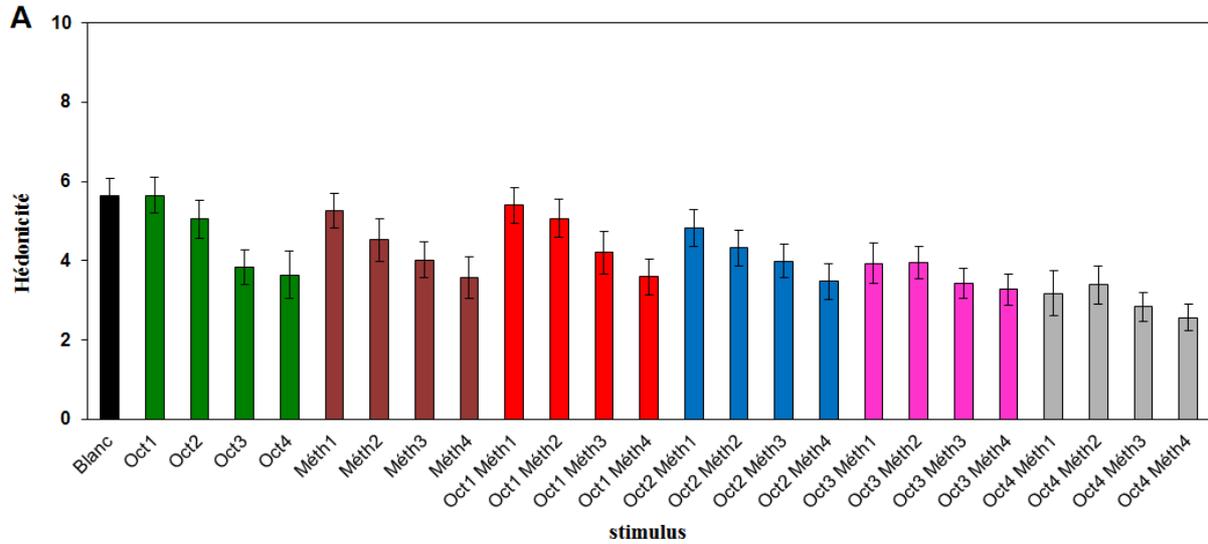


Figure 36: (A) Appréciation hédonique moyenne (\pm ES ; n=19) pour les différentes concentrations d'Octanal (Oct), de Méthional (Méth) et de leurs mélanges. (B) Corrélation entre l'appréciation hédonique moyenne et intensité odorante moyenne pour chacun des 25 stimuli du mélange Oct + Méth.

(r) coefficient de corrélation. Pour les deux figures A et B, le code couleur est le suivant : Vert = Oct seul, brun = Méth seul, rouge = mélange Méth + Oct1, bleu = Méth + Oct2, rose = Méth + Oct3, gris = Méth + Oct4.

Cette observation est parfaitement confirmée par la présentation du caractère hédonique en fonction de l'intensité moyenne perçue de chaque stimulus (Figure 36B). Plus l'intensité des stimuli augmente, plus l'appréciation diminue, ($r(25) = -0,92$; $p < 0.0001$). On peut remarquer qu'il n'y a en revanche pas de lien entre l'évolution du caractère hédonique des mélanges et la proportion perceptive des odorants (τ_{Oct} ; Figure 37) dans la mesure où la corrélation n'est pas significative ($r(16) = -0,34$; $p = 0.20$). Ces observations montrent que, contrairement au mélange Oct + Cit, ce n'est pas la qualité propre des odorants qui guide l'appréciation hédonique des mélanges Oct + Méth, mais l'intensité des stimuli.

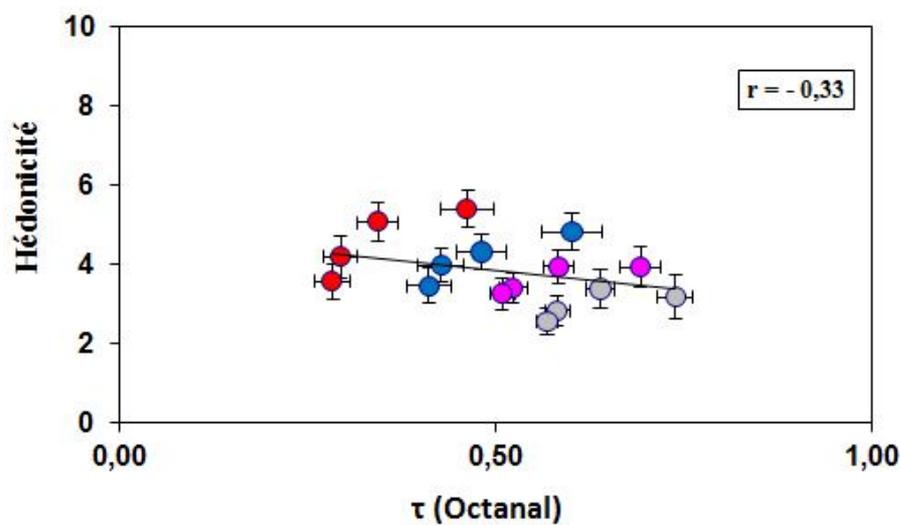


Figure 37: Evolution de l'appréciation hédonique des mélanges Oct + Méth en fonction de la proportion perceptive des odorants dans les mélanges ($\tau_{Octanal}$).

Les points représentent des moyennes sur le panel (\pm ES ; $n=19$). (r) coefficient de corrélation. Rouge : mélange Méth + Oct1, bleu : Méth + Oct2, rose : Méth + Oct3, gris : Méth + Oct4.

IV. Discussion

L'objectif des études psychophysiques décrites dans ce chapitre était de caractériser la perception par l'Homme de deux mélanges binaires d'aldéhydes, Oct + Cit et Oct + Méth, en fonction des proportions des deux odorants en mélange. Les caractéristiques d'intensité, de qualité et de caractère hédoniques ont été mesurées.

Cas du mélange Oct + Cit

Les résultats quantitatifs obtenus pour les mélanges Oct + Cit montrent que l'intensité perçue est inférieure à la somme des intensités des constituants pris isolément ($\sigma < 1$; Figure 27). Les deux composantes ne se comportent donc pas de manière indépendante (addition complète), mais génère un phénomène d'hypo-addition. De plus, sur l'ensemble des proportions étudiées pour ces deux composés et si l'on considère la variabilité des mesures (cf. ES ; Figure 27), l'intensité des mélanges suit la règle dite de la plus forte composante (Laffort and Dravnieks, 1982). Dans ce cas de figure, l'intensité du mélange est égale à l'intensité de la composante majoritaire. Ainsi, lorsque le Cit a la proportion d'intensité la plus importante dans le mélange ($\tau_{\text{Oct}} < 0.5$; Figure 27), alors l'intensité du mélange est égale à l'intensité de l'odeur du Cit seul et inversement lorsque c'est l'Oct qui est perceptivement majoritaire. La règle de la plus forte composante a été observée dans plusieurs études utilisant d'autres mélanges binaires et il semble que ce soit un cas assez général d'interaction, même si, pour les mélanges iso-intenses ($\tau \sim 0,5$), des déviations par rapport à cette règle sont souvent observées (Ferreira, 2012). Une seule des combinaisons étudiées pour ce mélange est significativement déviante par rapport à la règle de la plus forte composante. Il s'agit du mélange Oct1 Cit2 pour lequel l'intensité du mélange se retrouve dans la zone d'addition partielle (Figure 27) ; dans ce cas, l'intensité du mélange est supérieure à celle des composants hors mélange mais inférieure à leur somme.

Les résultats qualitatifs obtenus pour les mélanges Oct + Cit montrent tout d'abord une confusion entre les odeurs herbe et citronnelle des deux odorants. Cette confusion peut être reliée à la forte ressemblance des qualités odorantes entre ces deux odorants. En effet, si l'on

analyse les proportions de réponse pour les composés hors mélange (Figure 30), on peut observer que les fortes concentrations d'octanal (Oct3 et Oct4) génèrent une proportion importante de réponse « les deux odeurs », ce qui signifie que les sujets pensent que ces stimuli sont des mélanges de Cit et d'Oct alors que l'Oct est pur. Ceci est un peu moins vrai dans le cas du Cit, même si pour la plus forte concentration (Cit4), la proportion de réponse « les deux odeurs » est également importante. Cette confusion entre les odeurs de ces deux odorants, plus marquée semble-t-il pour l'Oct, peut aussi être mise en évidence par la proximité des descripteurs pour ces deux odorants, à savoir « herbe » pour l'Oct et « citronnelle » pour le Cit, qui renvoient à une même super catégorie « végétal ». De plus, le descripteur « herbe » de l'Oct étant moins précis que celui du Cit, cela peut aussi expliquer la plus grande confusion pour cet odorant (Rouby et al., 2005). Ces observations sont confirmées par les résultats de modélisation des probabilités de réponse pour ce mélange (Figure 31) qui montrent que la probabilité d'identification de l'odeur de l'Oct reste faible dans les mélanges Oct + Cit ; elle ne dépasse pratiquement pas 50%, même pour les mélanges ayant une proportion élevée de ce composé. La confusion des odeurs entraîne également une modélisation très atypique de la probabilité de réponse « les deux odeurs » (Figure 31) qui fournit ici une constante alors qu'elle est généralement de type quadratique avec un maximum à $\tau=0,5$. Ce résultat de modélisation souligne l'idée d'un niveau de confusion des odeurs donnant lieu à une proportion élevée de réponse liée à la présence des deux odeurs quelles que soient les proportions des constituants dans le mélange.

Si l'on confronte les résultats qualitatifs et quantitatifs pour le mélange Oct + Cit on peut tout d'abord émettre l'hypothèse que les qualités odorantes des deux odorants étant proches, cela contribue à l'évolution de l'intensité dans le mélange selon la règle de la plus forte composante. En effet, les sujets n'interprèteraient alors consciemment que la plus forte composante du mélange. Par ailleurs, le mélange Oct1 Cit2 est le seul mélange pour lequel cette règle n'est pas respectée. Ceci peut être le résultat de la qualité quasiment identique des deux odeurs mélangées. En effet Oct1 et Cit2 sont des stimuli d'intensité faibles qui, hors mélange, génèrent les plus fortes confusions entre les odeurs propres des odorants (Figure 30). Ce cas de figure peut donc être favorable à l'addition des intensités, comme s'il s'agissait de l'augmentation de la concentration d'un seul odorant, même si celle-ci reste partielle. De plus, le mélange Oct1 Cit2 porte essentiellement l'odeur du Cit, ce qui est également le cas pour les mélanges Oct1 Cit3, Oct1 Cit4, Oct2 Cit4 et Oct3 Cit4. Dans ces mélanges, contenant une

faible proportion d'Oct par rapport au Cit, on peut penser qu'il y a une synergie de l'odeur du Cit, mais cette hypothèse ne peut être confirmée que par des expériences complémentaires car les seules probabilités de réponse ne permettent pas de mettre en évidence la synergie. Si l'on s'intéresse à l'évolution du caractère hédonique dans les mélanges Oct + Cit (Figure 34), on peut penser qu'il est vraisemblablement lié à l'intensité de l'odeur, mais pas uniquement. La qualité de l'odeur joue aussi un rôle, comme cela a pu être mis en évidence dans quelques études (Callegari et al., 1998). Ainsi, plus la proportion d'Oct augmente dans le mélange, plus le caractère plaisant diminue.

Si l'on compare nos résultats concernant ce mélange à ceux disponibles dans la littérature scientifique, on peut remarquer des parallélismes intéressants. En effet, des études comportementales chez le rat montrent que, après apprentissage des mélanges, les niveaux de reconnaissance des mélanges et des composantes Oct et Cit dépendent largement des proportions des composantes dans les mélanges (Kay et al., 2003). En particulier, lorsque les mélanges comportent de fortes proportions de Cit, les rats évaluent leurs odeurs comme étant très proche de celle du Cit seul. A l'inverse, lorsque la proportion de Oct est forte dans le mélange, cela ne signifie pas nécessairement que l'odeur du mélange est proche de celle de l'Oct [cf. figure 1 de l'article de (Kay et al., 2003)]. Cette dissymétrie se retrouve dans nos résultats qualitatifs dans la mesure où la probabilité d'identification de l'odeur d'Oct reste faible même lorsque sa proportion est élevée dans le mélange (Figure 30). De plus, les résultats de modélisation des données qualitatives laissent penser qu'il y a une légère dominance perceptive de l'odeur du Cit à $\tau = 0,5$ (Atanasova et al., 2005), ce qui signifie que l'odeur de citronnelle est plus facilement identifiable dans le mélange qui contient la même intensité des deux odeurs (mélange iso-intense). Ce résultat est également en accord avec les observations faites chez les rats qui sont plus aptes à reconnaître l'odeur de Cit par rapport à celle d'Oct (Kay et al., 2003). Dans cette étude (Kay et al., 2003), les auteurs indiquent que pour certains ratios des odorants dans le mélange, la perception de ce dernier est synthétique ; cela signifie que l'odeur du mélange est différente de l'odeur des composantes. Dans nos résultats qualitatifs chez l'Homme, nous n'avons pas observé de perception synthétique significative dans la mesure où la proportion de réponse « autre odeur » reste très faible (< 10 %).

Cas du mélange Oct + Méth

Pour le mélange Oct + Méth, quel que soit le ratio des deux odorants dans les mélanges, l'intensité perçue pour un mélange est inférieure à la somme des intensités de ces constituants perçus hors mélange ($\sigma < 1$; Figure 29). Cette intensité est majoritairement supérieure à celle de la plus forte composante, ce qui indique un phénomène d'addition partielle, classiquement observé pour les mélanges binaires (Ferreira, 2012). Cette règle n'est cependant pas respectée pour le mélange Oct2 Méth3 qui induit une intensité intermédiaire entre celle des constituants pris isolément, soit un effet de compromis (Figure 29). Les résultats de la mesure de la qualité des mélanges montrent que les odeurs d'Oct et de Méth sont bien distinguées par les sujets et que le mélange est hétérogène, c'est-à-dire que les odeurs propres des odorants restent perceptibles dans les mélanges. Ceci est largement confirmé par les résultats de modélisation des probabilités de réponse pour ce mélange (Figure 33) qui sont en accord avec la théorie proposée par Olsson (1994). Ainsi lorsque le mélange contient majoritairement du Méth, les sujets identifient majoritairement l'odeur de bouillon. A l'inverse, lorsque l'Oct est majoritaire, alors c'est l'odeur d'herbe qui est le plus souvent identifiée. De même, c'est lorsque le mélange contient une proportion équivalente des deux odorants que la probabilité d'identifier les deux odeurs dans le mélange est la plus forte. Cependant, on note qu'il y a une nette dominance qualitative de l'odeur de l'Oct sur celle du Méth qui est observable au travers d'une probabilité d'identification de l'odeur d'herbe plus élevée dans les mélanges iso-intenses ($\tau = 0,5$; Figure 33). Ce type de dominance perceptive, initialement mis en évidence par Atanasova et al. (2005) s'avère être assez souvent observée dans les mélanges hétérogènes (Ferreira, 2012). Le mélange Oct2 Méth3 qui induit un effet de compromis sur l'intensité ne présente en revanche pas d'effet qualitatif spécifique, mis à part le profil assez particulier des proportions de réponse dans les mesures qualitatives pour Oct2. En ce qui concerne le caractère hédonique, l'Oct et le Méth semblent être appréciés de manière équivalente et leurs mélanges ne présentent pas d'évolution significative en fonction des proportions de chacun de ces odorants. Dans ce cas, il apparaît que seule l'intensité de l'odeur influence la valeur hédonique des mélanges : plus l'intensité moyenne du mélange augmente, moins l'odeur du mélange est appréciée (Figure 36). Cette observation est ainsi conforme aux résultats de (Distel et al., 1999) qui ont montré que pour de nombreuses odeurs, l'augmentation de l'intensité au-delà d'un certain niveau entraîne une diminution de la note hédonique.

Dans une étude publiée récemment, Burseg et De Jong ont observé un phénomène de masquage du Méth par l'Oct (Burseg and de Jong, 2009). Même si nous n'avons pas étudié de manière formelle le masquage, nos résultats psychophysiques ne semblent pas montrer de masquage au sens strict. Nos résultats vont plutôt dans le sens d'une dominance de l'odeur de l'Oct sur celle du Méth. Seuls les mélanges présentant de très fortes proportions d'Oct par rapport au Méth (Oct3 Méth1, Oct4 Méth1, Oct4 Méth2, Oct4 Méth3) engendrent des probabilités d'identification du Méth faibles. Ces différences entre les résultats peuvent être dues à des différences entre les concentrations mise en œuvre dans notre étude et celle de Burseg et De Jong. Ces derniers ont testé trois ratios différents et observent du masquage total pour les ratios les moins élevés en Méth. Ils observent cependant un masquage partiel dans un mélange iso-intense. Il est donc possible que la situation de masquage observée par ces auteurs soit comparable à nos mélanges contenant une forte proportion d'Oct par rapport au Méth. En effet, l'estimation des probabilités de réponse dans les mélanges contenant majoritairement de l'Oct montre que la probabilité d'identification de l'odeur de bouillon du Meth est très faible, ce qui serait compatible avec un masquage. On peut donc penser que les mélanges étudiés par Burseg et De Jong (2009) sont tous à $\tau > 0,5$.

En résumé, cette étude psychophysique démontre que les mélanges que nous avons étudiés (Oct + Cit et Oct + Méth) induisent différents types d'hypo-addition au niveau quantitatif. Lorsque l'Oct est en mélange avec le Cit, le mélange suit la loi de la plus forte composante. Cependant, lorsque l'Oct est en mélange avec le Méth, un effet d'addition partielle est majoritairement observé. Ces interactions quantitatives peuvent aussi être reliées à la qualité de l'odeur perçue. Une confusion de la qualité d'Oct et Cit est observée et une diminution de l'identification du Méth en présence d'Oct a été mise en évidence. La valeur hédonique de l'odeur de ces deux mélanges dépend de leur intensité, et aussi parfois de leur qualité. Les relations entre ces résultats et ceux observés au niveau des RO et des NSO sont discutées dans la partie suivante sous la forme d'une discussion générale.

Chapitre IV : Etude du mélange acétate d'isoamyle et whisky lactone

La première étape du codage de l'information olfactive a lieu au niveau des neurones olfactifs (NSO) lorsque les molécules odorantes interagissent avec des récepteurs olfactifs (RO) localisés dans la membrane des NSO. Il a été démontré que chaque molécule odorante active une combinaison de NSO/RO spécifique mais potentiellement chevauchante avec celle d'une autre molécule. Cependant, on s'interroge encore sur la manière dont le message olfactif est traité au niveau périphérique, notamment lorsque le système olfactif est confronté à des mélanges d'odorants.

Plusieurs études psychophysiques menées chez l'Homme et l'animal ont en effet démontré que l'intensité perçue d'un mélange est dans la plupart des cas plus faible ou plus forte que la somme arithmétique de l'intensité perçue de chaque composant du mélange. Ces observations suggèrent que différents processus peuvent influencer la perception finale d'un mélange, notamment des interactions au niveau périphérique.

Afin de mettre en évidence un lien entre les réponses induites par un mélange d'odorants au niveau périphérique et au niveau perceptif, trois approches ont été mises en œuvre: i) la mesure de l'activation de RO par imagerie calcique dans des cellules HEK293 transfectées; ii) l'enregistrement de l'activité électrique de NSO dans la muqueuse olfactive de rat par des mesures d'activité unitaire et d'électroolfactogramme (EOG); iii) l'évaluation sensorielle de l'intensité perçue de l'odeur chez l'Homme. Les molécules odorantes étudiées étaient l'acétate d'isoamyle (ISO) et la whisky lactone (WL), deux molécules qui contribuent à la flaveur du vin rouge et qui se caractérisent par des notes fruitée et boisée, respectivement. Ces molécules ont été étudiées de manière isolée et en mélange.

Les résultats des études d'imagerie calcique et d'EOG montrent que l'ISO et la WL peuvent activer simultanément les RO étudiés (OR1G1 et OR52D1) ainsi que les NSO de rat et confirment que les réponses au mélange sont différentes de la somme des effets des molécules seules. Dans les cellules HEK293 transfectées par le récepteur OR1G1, le mélange provoque un phénomène de suppression qui s'apparente à un effet de compromis lorsque le mélange contient une faible concentration de WL et à un effet de soustraction pour de plus fortes concentrations de WL (figure 1A). Le profil de réponse de OR52D1 est tout à fait différent car dans ce cas, un effet d'addition partielle (appelé effet synergique dans l'article) est observé (figure 1B). Au niveau de la muqueuse olfactive de rat, l'addition de WL inhibe

l'activation des NSO induite par l'ISO dans ~40% des cas et induit un effet d'addition (synergique) dans ~20% des cas (Tableaux 3 et 4). Ces effets semblent dépendre de l'effet propre de la WL dans les sites analysés: un effet inhibiteur est observé lorsque les NSO répondent faiblement, voire pas du tout, à la WL seule tandis qu'un effet d'addition est en majorité enregistré dans les sites où les NSO répondent aussi bien à l'ISO qu'à la WL appliqués isolément. Chez l'Homme, les mélanges contenant de fortes concentrations de WL diminuent l'intensité perçue de l'ISO (masquage de l'odeur fruitée, figure 9). Par contre, lorsque la concentration de WL dans les mélanges est faible, une augmentation de la note fruitée portée par l'ISO est enregistrée (synergie de la note fruitée).

Cette étude met clairement en évidence une similitude entre les réponses au mélange des RO et des NSO, ce qui suggère que ces deux molécules interagissent au niveau des RO. Elle montre également que ce mélange peut produire des effets différents (suppression et addition/synergie) qui semblent dépendre des propriétés de liaison des RO/NSO répondant au mélange. La forte influence de la WL sur les réponses des RO/NSO à l'ISO mesurées par imagerie calcique et par les techniques électrophysiologiques concorde avec le fait que la WL affecte de manière importante l'intensité de l'odeur fruitée portée par l'ISO chez l'Homme. On peut ainsi supposer que l'effet additif/synergique produit par la WL au niveau des RO/NSO conduit à une augmentation de la note fruitée perçue.

En conclusion, cette étude met en évidence, de manière indéniable, un parallèle entre les réponses des RO et des NSO au mélange ISO + WL et les réponses perceptives chez l'Homme, ce qui conforte pleinement l'hypothèse d'une forte implication du traitement périphérique dans la construction de l'image sensorielle des mélanges d'odorants. Un traitement additionnel de l'information au niveau bulbaire et/ou cortical n'est cependant pas exclu.

BEHAVIORAL NEUROSCIENCE

Interactions of odorants with olfactory receptors and receptor neurons match the perceptual dynamics observed for woody and fruity odorant mixtures

M. A. Chaput,¹ F. El Mountassir,² B. Atanasova,² T. Thomas-Danguin,² A. M. Le Bon,² A. Perrut,³ B. Ferry¹ and P. Duchamp-Viret¹

¹UMR 5292, Centre de recherche en neurosciences de Lyon, Université de Lyon, CNRS, INSERM, 50 avenue Tony Garnier, F-69366 Lyon, France

²Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR6265 CNRS, UMR1324 INRA, Université de Bourgogne, Agrosup Dijon, F-21000 Dijon, France

³Département Mathématiques, Institut Camille Jordan, Université de Lyon 1, 21 Avenue Claude Bernard, T-69622 Villeurbanne, France

Keywords: human, odour mixture, olfactory receptor neurons, olfactory receptors, rat

Abstract

The present study aimed to create a direct bridge between observations on peripheral and central responses to odorant mixtures and their components. Three experiments were performed using mixtures of fruity (isoamyl acetate; ISO) and woody (whiskey lactone; WL) odorants known to contribute to some of the major notes in Burgundy red wine. These experiments consisted of (i) calcium imaging of human embryonic kidney cells (HEK293T) transfected with olfactory receptors (ORs); (ii) single-unit electrophysiological recordings from olfactory receptor neurons (ORNs) and analyses of electro-olfactogram (EOG) responses in the rat nose *in vivo*; and (iii) psychophysical measurements of the perceived intensity of the mixtures as rated by human subjects. The calcium imaging and electrophysiological results revealed that ISO and WL can act simultaneously on single ORs or ORNs and confirm that receptor responses to mixtures are not the result of a simple sum of the effects of the individual mixture compounds. The addition of WL to ISO principally suppressed the ORN activation induced by ISO alone and was found to enhance this activation in a subset of cases. In the human studies, the addition of high concentrations of WL to ISO decreased the perceived intensity of the ISO. In contrast, the addition of low concentrations of WL enhanced the perceived intensity of the fruity note (ISO) in this mixture, as it enhanced EOG responses in ORNs. Thus, both OR and ORN responses to ISO + WL mixtures faithfully reflected perceptual response changes, so the odour mixture information is set up after the peripheral stage of the olfactory system.

Introduction

Olfactory receptor neurons are located within the nasal sensory mucosa, where they mediate the first step of olfactory information coding and interact individually with numerous structurally distinct pure odorant molecules (Duchamp *et al.*, 1974). Olfactory receptor neuron (ORN)–odorant interactions are mediated by a large multigenic family of molecular olfactory receptors (ORs); each ORN expresses one type of OR (Buck & Axel, 1991). Hundreds of ORs can be expressed (Godfrey *et al.*, 2004; Malnic *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2002; Zhao & Firestein, 1999), and each of them is activated by a broad panel of odorant molecules (Araneda *et al.*, 2000, 2004; Duchamp-Viret *et al.*, 1999; Malnic *et al.*, 1999; Kajiya *et al.*, 2001). The redundant sensitivities of ORs lead to overlaps of active ORN combinations. Thus, one could ask how the peripheral message increases in specificity, thereby allowing the olfactory system to make

subtle distinctions at the final level of processing. The basis of this ability may lie in the fact that the olfactory system generally processes complex mixtures of elementary odorants rather than the single chemical compounds that are generally used in most olfactory studies.

In humans, the perception of mixture intensity has been shown to be higher or lower than the simple arithmetic sum of the perceived intensity of each component of the mixture (Atanasova *et al.*, 2005; Baker, 1964; Berglund & Olsson, 1993; Cain & Drexler, 1974; Jones & Woskow, 1964; Laing & Jinks, 2001). Several processes, such as synergy or masking (i.e., enhancement or reduction of odour intensity), appear to influence the final odour perception. Bell *et al.* (1987) reported that perceptual interactions between the components of a binary mixture take place at the peripheral level. This finding has been validated by *in vivo* electrophysiological and calcium imaging experiments in which odorants were shown to compete for their respective receptor sites as agonists or antagonists of OR/ORN activity (Brodin *et al.*, 2009; Duchamp-Viret *et al.*, 2003; Oka *et al.*, 2004; Rospars *et al.*, 2008; Sanz *et al.*, 2005; Spehr *et al.*, 2004). The interaction of the numerous molecules comprising natural odours with

Correspondence: M. A. Chaput, as above.
E-mail: chaput@olfac.univ-lyon1.fr

Received 1 March 2011, accepted 1 December 2011

ORs/ORNs should refine the active assembly signal by means of suppression and synergy (Mc Clintock & Ache, 1989; Kurahashi *et al.*, 1994; Michel & Ache, 1992, 1994; Michel *et al.*, 1991; Daniel *et al.*, 1996).

The present study focuses on the hypothesis that crucial steps in the process of mixture encoding occur after the peripheral olfactory system. This hypothesis was assessed by (i) calcium imaging of HEK293T cells transfected with OR expression vectors; (ii) recording of *in vivo* ORN responses in the rat olfactory mucosa; and (iii) measurement of the perceived intensity of odorant mixtures by human subjects. Two odorant molecules, ISO and WL, which characterize certain fruity and woody notes of red wine, were chosen and were used singly and in mixtures in the three experiments. Our results constitute an original data set, establishing a direct link between the interactions of odorant molecules with ORs/ORNs and perceptual processes.

Materials and methods

Odorants used for in vitro calcium imaging and In vivo electrophysiological and psychophysical studies

Two odorant molecules that are generally present in red Burgundy wine aroma were used for the experiments (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The first, β -methyl- γ -octalactone, is generally referred to as whiskey lactone and is abbreviated WL (CAS number, 39212-23-12; saturated vapour pressure (SVP) at 25 °C, 8.28×10^{-7} M). This odour has a major oak wood origin and is described as evoking a woody and coconut odour (Arctander, 1969). The second odour used in the experiments, isoamyl acetate, is abbreviated ISO (CAS number, 123-92-2, 8; SVP at 25 °C, 3.05×10^{-4} M). It is described as evoking a fruity and banana odour (Arctander, 1969). These odorants were analysed using a Hewlett Packard 5890 gas chromatograph equipped with a split/splitless injector, a flame ionisation detector and a sniffing port (Atanasova *et al.*, 2005). Both odours were 100% chemically pure, and no odorant impurities were detected as determined by gas chromatography-olfactometry by three trained subjects.

In vitro human OR activation study

Culture and transient transfection of HEK293T cells

A limited number of experimental studies have investigated the chemical repertoire of human olfactory receptors. ISO was reported to activate OR1G1 and OR52D1 (Sanz *et al.*, 2005; Matarazzo *et al.*, 2005). To our knowledge, however, the receptors activated by WL are unknown. We therefore focused on the OR1G1 and OR52D1 receptors to determine whether they interact with WL and to examine the full range of dose–response activity for ISO and WL. For these experiments, human embryonic kidney 293T cells (HEK293T) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% foetal bovine serum (PAA laboratories, Les Mureaux, France), 100 μ M Eagle's non-essential amino acids and 2 mM GlutaMAX (Invitrogen, Life Technologies, Villebon sur Yvette, France). The cells were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 10% CO₂. Twenty-four hours prior to transfection, the cells were seeded in 96-well plates (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) that had been pre-coated with polyethyleneimine (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) at a density of 3×10^4 cells per well. In each well, the cells were transfected with either 50 ng pCMV-RhoTagOR1G1 or 50 ng pCMV-RhoTagOR52D1. In addition to

either of these OR expression plasmids, 10 ng each of pcDNA3.1/HygroG α 16, pCI-RTP1S, pCI-RTP2, pCI-REEP and pMyr-FLAG-Ric-8A plasmids were added to each well. The transfections were performed with Fugene HD (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's instructions. Mock transfections were conducted by transfecting the cells with the pCMV-RhoTag plasmid in place of the OR expression plasmid; the other plasmids (pcDNA3.1/HygroG α 16, pCI-RTP1S, pCI-RTP2, pCI-REEP and pMyr-FLAG-Ric-8A plasmids) were co-transfected with pCMV-RhoTag to account for any potential nonspecific responses due to these plasmids. The Ca²⁺ imaging experiments were performed 24 h following the transfection.

Ca²⁺ imaging

The transfected cells were washed once in Hanks' balanced salt solution (HBSS; Invitrogen) and supplemented with 20 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid) and 2 mM CaCl₂. The cells were then loaded with 5 μ M fura-2 AM (Molecular Probes, Life Technologies, Villebon sur Yvette, France) and 0.05% pluronic acid (Molecular Probes, Life Technologies, Villebon sur Yvette, France) for 30 min at 37 °C. Finally, the loading solution was removed, and 50 μ L of the HBSS–HEPES–CaCl₂ buffer was added to each well. The odorant solutions were prepared as 100-mM stocks in dimethyl sulfoxide and were preserved at –20 °C. Immediately prior to application, the stock solutions were diluted in the HBSS–HEPES–CaCl₂ buffer to the appropriate concentrations. Each odorant solution (100 μ L) was manually applied with a micropipette in only one well. All measurements were made in duplicate. Calcium imaging was performed at 28 °C using an inverted epifluorescence microscope (Nikon TiE) equipped with an EMCCD camera (Andor LucaR). The Ca²⁺ responses were recorded at 510 nm with alternating excitation at 340 nm or 380 nm under 10 \times magnification. The images were captured every second over a period of 3 min. The NIS-Elements AR software (Nikon) was used for data acquisition and analysis. The reported Ca²⁺ response refers to the percentage of responding cells normalised to those responding to the application of 100 μ M ATP in a field containing \sim 700 cells. ATP was used as a control to ensure the ability of the cells to exhibit a Ca²⁺ response because this molecule stimulates HEK cell-intrinsic purinergic receptors coupled to the inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) pathway via endogenous G proteins. Each experiment was performed at least three times.

In vivo rat electrophysiology

Surgical methods

The electrophysiological experiments were performed on adult male Wistar rats (250–300 g, purchased from Charles River Laboratories, France). The experiments were performed in accordance with the European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC) for the care and use of laboratory animals; all efforts were made to reduce the number of animals used. The rats were first injected with Rimadyl (carprofen; Pfizer Animal Health, Pfizer Santé Animale, Paris, France; ; 0.2 mg/kg) and anaesthetised 30 min later with an intraperitoneal injection of Equithesin (mixture of pentobarbital sodium and chloral hydrate) at an initial dose of 3 mL/kg. The rats were injected with supplemental doses of anaesthetic as necessary to maintain a deep level of anaesthesia. The degree of anaesthesia was determined by the depth and rate of the rat's respiratory rhythm and the lack of withdrawal of the leg following a moderately intense toe

pinch. The rectal temperature of the rats was maintained at 37 ± 0.5 °C using a homeothermic blanket (Harvard Apparatus, USA). The surgical wounds of the animals were regularly infiltrated with 2% procaine. For electrophysiological recordings, the anaesthetised animals were tracheotomised and secured in a stereotaxic apparatus. Access to the mucosa (endoturbinat II) was then achieved by removing the nasal bones and gently moving aside the dorsal recess underlying these bones (Duchamp-Viret *et al.*, 1999).

Electrophysiological recordings and data analyses

Single-unit action potentials were recorded using metal-filled glass micropipettes (2–4 M Ω ; Gesteland, 1959) and electro-olfactograms (EOGs; local field potentials recorded at the olfactory mucosa surface in response to odour puffs) with 5- μ m-diameter glass micropipettes filled with a saline solution (NaCl, 9‰). The two signals were transferred on-line using conventional amplifiers to a Data Tape Recorder (Biologic, France) and to a CED-1401 data acquisition system (Cambridge Electronic Design Ltd., UK) connected to a computer. The spikes and EOG signals were filtered between 300 and 3000 Hz and between 0 and 30 Hz, respectively. The signal-to-noise ratio of the spike recordings was ≥ 10 . The EOG and spike signals were sampled at 15 kHz and 200 Hz, respectively, using a CED-1401 data acquisition system. The single-unit nature of the recorded spikes was first verified during the experiment by triggering the sweep at a level just above the background noise with the aid of a storage oscilloscope. This process allowed us to determine the characteristics of the polyphasic spike of the cell under examination to ensure that the recordings were attributable to the same cell throughout each of the experimental procedures. The single-unit activity was then triggered using the Spike2 script language associated with the CED-1401 system. The spikes were detected by determining the height of the signal above a triggering level and subsequently by visual inspection of the consistency of the shape of the sorted spikes. The protocol for determining the response characteristics was described in detail by Duchamp-Viret *et al.* (1989). Briefly, response characteristics were determined using the Mann–Whitney test to compare the interspike intervals recorded during the 2-s stimulation and the 20 s preceding the stimulation. This method allowed determination of whether there was a significant change in firing activity and to quantify any difference in terms of spikes/min. The reported EOG amplitudes (in mV) are the averaged value of five measurements.

Stimulation procedure

The stimuli were delivered using a dynamic-flow multistage olfactometer, which ensured precise control of the stimulation parameters and allowed for delivery of up to 12 different odorant concentrations (Vigouroux *et al.*, 1988). The odorants were stored in U-shaped tubes filled with absorbent pellets (Duchamp-Viret *et al.*, 2003). The mixtures were generated from the SVP of the two odorants. Between the stimulation procedures, pure air entered in parallel in the dilution stage of the olfactometer through two U-shaped tubes filled only with absorbent pellets (blank tubes). For single odorant molecule delivery, one of the blank tubes was replaced with a tube containing the selected odorant. To obtain binary mixtures containing this odorant, the second blank tube was replaced by a tube containing the second selected molecule. With this system, the same quantity of molecules for each odorant was delivered during the single-component and mixture presentations. All available concentrations in each configuration for each of the two odorants and for their different mixtures are shown in Table 1. Twelve to sixteen different concentrations were available

from discrete dilutions ranging from 1/22480 to 1/4 of the SVP of each odorant at atmospheric pressure. To obtain the lower concentrations, the saturated vapour sources were prediluted by 10 before entering into the dynamic-flow multistage olfactometer. In this case, the olfactometer pulled 10 mL (instead of 100 mL for the highest concentrations) from the U-shaped tube containing odourised pellets and mixed these 10 mL with 90 mL of pure air. Using these two dilutions, the different combinations of the ratio between the first and second component were set at 1/1, 1/10 or 10/1. The stimulus presentation consisted of 2-s square odorant pulses delivered on the mucosa at a constant temperature (22 °C) and flow rate (200 mL/min). For each odorant and for each combination of the two odorants, the stimuli were delivered from the lowest to the highest concentration, and a delay of at least 2 min was used between two successive presentations.

Experimental paradigm

The single-cell activities and the EOG signals were recorded from the endoturbinat II region. An EOG recording session consisted of first delivering the ISO and WL separately at different concentrations. Then, the odorant mixtures were delivered in ratios of 1/1, 1/10 and 10/1 using the same concentration range as for the unmixed odorants. Each stimulus was presented five times at intervals of at least 1 min, so as to obtain EOG amplitudes averaged over five responses. The same protocol was used for single ORN recordings except that (i) the single-cell responsiveness to the ISO and WL odorants was first determined by delivering the odorants at a concentration close to the SVP (Duchamp-Viret *et al.*, 1999); and (ii) measurements made for the threshold odorant concentrations were only repeated twice (at a minimum), given that it is currently not possible to record an ORN for a sufficient amount of time to repeat the same stimulus five times and to establish the concentration–response curves for two molecules and their mixtures at the three chosen ratios. This limitation led us to select ORNs that responded to at least one of the two components to further establish their concentration–response curves for each single odorant and their mixtures at the three different ratios. A minimum of five concentrations was tested to ensure that the interactions between the odorants were dynamically quantified from the threshold level to the maximal concentration. This detail constitutes a critical aspect of the present paradigm, given that results from biochemical assays (Breer & Boekhoff, 1991; Noe & Breer, 1998) and patch-clamp studies (Olson & Derby, 1995) have shown that binding interactions of mixture components with ORs/ORNs depend on concentration.

Analysis and comparison of ORN concentration–response curves

The EOG signal and single-unit concentration–response curves were fitted to linear models using multiple regression analyses (Jobson, 1991). The responses of a single site to every concentration and to the different mixtures of ISO and WL were assumed to be modelled by the following equation: response to the mixture = $a + b \times \log(\text{ISO}) + c \times \log(\text{WL}) + d \times \log(\text{ISO}) \times \log(\text{WL}) + \text{error}$. In the first step, the model assumes normality and constant variance for the residual term. The measured data points were tested to verify the appropriateness of this model. The relative contributions of the ISO and WL odours to the responses were examined by considering the adjusted R^2 of the multiple regression analysis, the Fisher test and Mallows' Cp test. Using these estimates of the standardised total mean square error for the current dataset, the mixture responses were found to depend on (i) $\log(\text{ISO})$ only; (ii) both $\log(\text{ISO})$ and $\log(\text{WL})$;

TABLE 1. Odour stimuli used in the electrophysiological study: calculated concentrations of the two odorants and their mixtures in the ratios 1/1, 1/10 and 10/1

SV dilutions Scale 1	SV dilutions Scale 10	ISO (M) 3.05×10^{-4} M	WL (M) 8.28×10^{-7} M	ISO + WL (M)		
				1/1	1/10	10/1
22480		1.36×10^{-8}	3.69×10^{-11}	1.36×10^{-8}	1.39×10^{-8}	NA
12640		2.41×10^{-8}	6.55×10^{-11}	2.42×10^{-8}	2.48×10^{-8}	NA
7120		4.28×10^{-8}	1.16×10^{-10}	4.30×10^{-8}	4.40×10^{-8}	NA
4000		7.63×10^{-8}	2.07×10^{-10}	7.65×10^{-8}	7.83×10^{-8}	NA
2248	2248	1.36×10^{-7}	3.69×10^{-10}	1.36×10^{-7}	1.39×10^{-7}	1.36×10^{-7}
1264	1264	2.41×10^{-7}	6.55×10^{-10}	2.42×10^{-7}	2.48×10^{-7}	2.41×10^{-7}
712	712	4.28×10^{-7}	1.16×10^{-9}	4.30×10^{-7}	4.40×10^{-7}	4.28×10^{-7}
400	400	7.63×10^{-7}	2.07×10^{-9}	7.65×10^{-7}	7.83×10^{-7}	7.63×10^{-7}
224.8	224.8	1.36×10^{-6}	3.69×10^{-9}	1.36×10^{-6}	1.39×10^{-6}	1.36×10^{-6}
126.4	126.4	2.41×10^{-6}	6.55×10^{-9}	2.42×10^{-6}	2.48×10^{-6}	2.41×10^{-6}
71.2	71.2	4.28×10^{-6}	1.16×10^{-8}	4.30×10^{-6}	4.40×10^{-6}	4.28×10^{-6}
40	40	7.63×10^{-6}	2.07×10^{-8}	7.65×10^{-6}	7.83×10^{-6}	7.63×10^{-6}
	22.48	1.36×10^{-5}	3.69×10^{-8}	1.36×10^{-5}	NA	1.36×10^{-5}
	12.64	2.41×10^{-5}	6.55×10^{-8}	2.42×10^{-5}	NA	2.41×10^{-5}
	7.12	4.28×10^{-5}	1.16×10^{-7}	4.30×10^{-5}	NA	4.28×10^{-5}
	4	7.63×10^{-5}	2.07×10^{-7}	7.65×10^{-5}	NA	7.63×10^{-5}

NA, not available.

or (iii) on log(ISO), log(WL) and log(ISO) \times log(WL). WL was assumed to have no influence on ISO in the first case and to interfere with ISO in the other two cases. Two types of interaction were defined according to the psychophysical definitions presented in the introduction: suppression, if the curve of the mixture reflected lower responses than the responses to the most efficacious component; and synergy, for responses that were higher than the responses to the most efficacious component. Suppressions were further subdivided into partial and complete suppression via analysis of the values of the b and c coefficients.

Psychophysical studies in humans

Stimulation procedure

The static olfactometry technique and materials used in this study were selected for their suitability in flavour analysis (Pet'ka *et al.*, 2000; Atanasova *et al.*, 2004). The odorants were diluted in purified water (MilliQ system, Millipore[®], France) with an electrical resistance of 18 M Ω cm⁻¹. The odorants were stored in Teflon[®] bags (49 \times 49 cm, 20 L capacity, equipped with a Teflon[®] connector; Interchim France). The bags were filled with 250 mL of the odorant solution and 17 L of pure nitrogen. The odorants were prepared 12 h prior to the first measurement to ensure equilibrium between the liquid and gaseous phases, and were maintained between 20 and 22 $^{\circ}$ C throughout the experiments and the evaluations. Headspace concentrations of the odorants in the bags were measured using Tenax trapping, and the amount of each odorant present in the headspace sample was determined using calibration curves. The experimental desorption and analysis parameters are described elsewhere (Atanasova *et al.*, 2004).

Because the major interest in oenology is to understand how the fruity note is modulated by different concentrations of the woody note, a single concentration of ISO and four different concentrations of WL were chosen on the basis of previous experiments (Table 2; Atanasova *et al.*, 2005). ISO concentrations were set at suprathreshold levels corresponding to the mean ISO concentration in red wines (ISO, airborne concentration: 3.0×10^{-8} M_{N2}; Cabanis *et al.*, 1998). For WL, the lowest concentration (WL1, airborne concentration: 3.2×10^{-12} M_{N2}) was chosen below the lowest individual detection

TABLE 2. ISO and WL concentrations used in the psychophysical study for the mixtures C1 to C4; only WL concentrations were changed

Odorants	Odorant concentrations (M _{N2})			
	C1	C2	C3	C4
ISO	3.0×10^{-8}	3.0×10^{-8}	3.0×10^{-8}	3.0×10^{-8}
WL	3.2×10^{-12}	9.6×10^{-12}	3.2×10^{-10}	5.1×10^{-10}

threshold of the sensory panel. The next highest concentration of WL (WL2, 9.6×10^{-12} M_{N2}) corresponds to the mean concentration of WL found in red wines matured in oak barrels (Cerdán *et al.*, 2002). Finally, the two highest WL concentrations were chosen to be just above the highest individual detection threshold of the panel (WL3, 3.2×10^{-10} M_{N2}) and just above the highest individual recognition threshold of the sensory panel (WL4, 5.1×10^{-10} M_{N2}). A total of four stimuli consisting of different concentrations of ISO and WL were presented to the subjects and are referred to by the following abbreviations: ISO + WL1, ISO + WL2, ISO + WL3 and ISO + WL4.

Sensory panel subjects and the psychophysical study experimental procedure

Thirteen volunteers (nine women and four men between 20 and 42 years of age) who had previous experience in olfactory tests participated in the experiment. These subjects were selected from 43 candidates on the basis of their performance on several olfactory tests and an absence of anosmia to the odorants used in the study. The determination of odour detection and the recognition threshold for each subject of the sensory panel were established in a previous study (Atanasova *et al.*, 2005). Prior to the beginning of the experiment, the subjects declared having no allergies or difficulties smelling. At the time of recruitment, the subjects were informed that they would be asked to smell different volatile compounds that can be found in wine or in other food products. They were further informed regarding the details of the experimental protocol prior to the beginning of the experiment. They signed an informed

consent form, but the aim of the experiment was not revealed. The subjects were asked to avoid smoking, drinking or eating for at least 1 h before each session and were compensated for their participation.

Experimental procedure

A 1-h familiarisation procedure was performed on a day prior to the test session to familiarise the subjects with the odour mixture intensities and quality rating process. A 1-h test session was subsequently performed and consisted of two blocks. Within each block, the subjects were asked to smell successively the contents of each of the nine bags. In the first block, the subjects were asked to rate the overall perceived odour intensity. In the second block, the subjects were instructed to rate the intensities of the fruity and woody odours. Each of the stimuli was presented five times. The order of presentation was balanced across the repetitions and was identical for all subjects.

The intensity ratings were established by use of a modified 1-butanol reference scale procedure (Atanasova *et al.*, 2004, 2005). This methodology consists of a direct line scaling technique that is based on five memorised references of 1-butanol intensity levels corresponding to five concentrations of 1-butanol in odourless mineral oil (50, 100, 200, 400 and 8000 mg/L). Prior to each testing session, the subjects smelled the five intensity references of 1-butanol and were instructed to memorise these intensities. During the experiment, the subjects rated the perceived intensity on a 13-cm line scale labelled at each end (no intensity to very strong intensity). This scale was divided into five equally spaced segments (1–5) corresponding to the five intensity levels of the 1-butanol odour references. The judged intensity was expressed as a score ranging from 0 to 13. Given the direct scaling procedure used and the fact that the 1-butanol references elicited perceived intensities that were equidistant in terms of intensity perception, it may be concluded that this scale respected both interval and ratio properties over the range experienced by the subjects, i.e., the odours would not be perceived to be at intensities that were too close to the ends of the graphic scale. Moreover, a preliminary study using the same methodology and the same sensory panel indicated that the intensity score given to an odourless stimulus on this scale was not statistically significantly different from 0. This last control was necessary to confirm ratio properties of the intensity scale.

Data analysis

Data acquisition was performed using FIZZ software (Biosystèmes, Couternon, France). For each subject and each mixture, we calculated the differences ($IF_m - IF_a$) and ($IW_m - IW_a$) between the intensities of the fruity (F) and woody (W) odour within the mixture (m) and alone (a). Repeated-measures ANOVAs were performed on these calculated individual differences to test for differences between mixtures with increasing concentrations of the WL odour; the subjects were considered random factors and the stimuli (i.e., the mixtures) as fixed factors.

We performed a *t*-test to assess whether the mean difference between the fruity and woody odour intensity within a mixture and alone was significantly different from zero for each mixture. For a given mixture, a difference that was significantly higher than zero indicated that the mixture induced significant synergy with the fruity or woody odour. This conclusion was reached because the intensity of the fruity or woody odour was perceived to be higher within the mixture as compared to the intensity of the given odour alone. Conversely, a difference that was significantly lower than zero

indicated that the fruity or woody odour was significantly masked within the mixture.

Statistical analyses were conducted using SAS[®] software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), release 8.1, and the MIXED procedure therein.

Results

Calcium imaging study: in vitro human OR activation

HEK293T cells transiently expressing OR1G1 or OR52D1 were equivalently activated by ISO (~4% responding cells at an ISO concentration of 10^{-3} M). WL also stimulated both receptors in a concentration-dependant manner (Supporting Information Fig. S1). However, the response elicited by WL was higher for OR52D1-expressing cells than for OR1G1-expressing cells (~11 and 4% responding cells at a WL concentration of 10^{-3} M, respectively). Additionally, ISO was more efficient than WL in activating OR1G1, whereas the opposite was true with respect to OR52D1 activation.

To examine the responses of olfactory receptors to WL + ISO mixtures, we implemented the same strategy used in the psychophysical studies, i.e., increasing concentrations of WL were added to a single concentration of ISO. The most effective ISO concentration below the maximum concentration was used, i.e. 5×10^{-4} and 3×10^{-4} M for OR1G1 and OR52D1, respectively. These concentrations of ISO were mixed with increasing concentrations of WL, ranging from 10^{-9} to 10^{-3} M. Each receptor was stimulated by 10 different binary mixtures. The responses of the receptors to mixtures were compared to the responses induced by ISO and WL delivered alone.

As shown in Fig. 1A, the mixture of ISO with WL had a suppressive effect on OR1G1-expressing cell responses. However, the strength of this suppression varied according to the WL concentration in the mixture. When WL concentrations were lower than 10^{-5} M, the values of the responses to the mixture were between the values of the responses to the odorants alone (i.e., lower than ISO but higher than WL). For WL concentrations higher than 10^{-5} M, the responses to the mixtures were lower than those induced by WL and ISO alone. This finding suggests that, in the presence of ISO, WL acts as an antagonist even at high concentrations. A different response profile was observed for OR52D1 (Fig. 1B). The ISO + WL mixture resulted in an increase in the OR52D1 response when compared to the responses to the odorants alone. This finding suggests that WL and ISO act synergistically for this OR.

Electrophysiology

Influence of WL on ISO responses as determined by EOG recordings

No relationship was identified between the location of the EOG recording site and the sensitivity to stimuli or the effect of WL on the ISO-induced response. As shown in Table 3, a total of 52 complete EOG series were analysed. ISO delivery induced EOG responses in 100% of the recording sites, whereas WL induced a response in 65% of the recording sites. WL had a suppressive effect on ISO-induced EOGs in ~40% of the cases and had a synergistic effect in ~21% of the cases. In the remaining 39% of the cases, the EOGs induced by ISO alone and in combination with WL had similar amplitudes and dynamics over the concentration range, suggesting that the presence of WL did not influence the ISO response. The suppressive effect of WL on ISO EOGs was variable and primarily occurred in situations where the WL alone did not induce an EOG response (14 out of 21 suppressions).

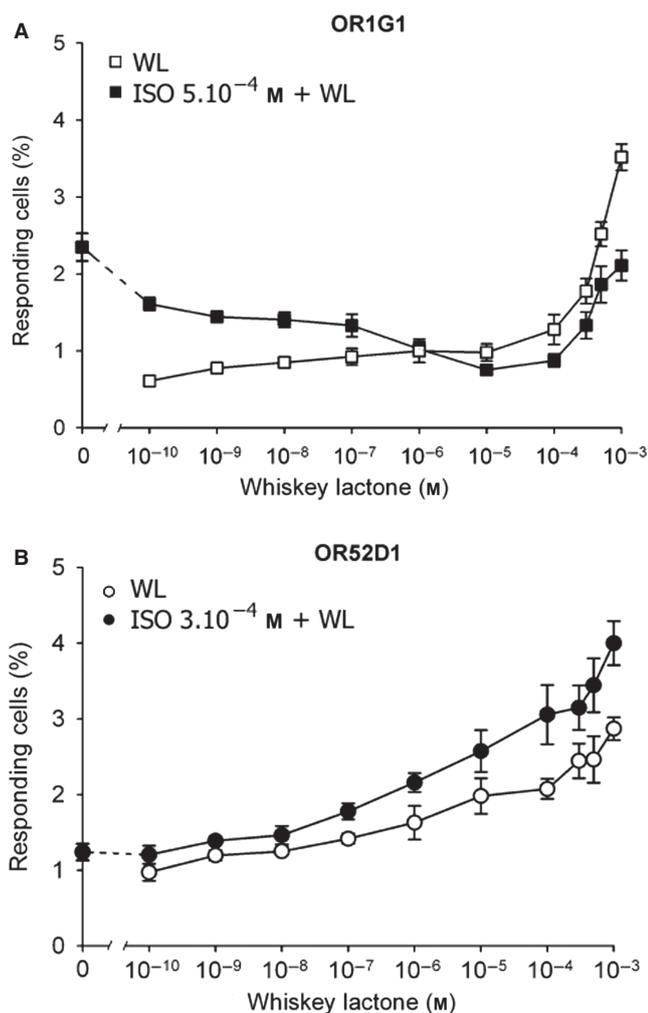


FIG. 1. The responses of (A) OR1G1- and (B) OR52D1-expressing HEK293T cells to the ISO + WL binary mixtures and to the odorants delivered alone. The OR1G1- and OR52D1-expressing cells were stimulated by mixtures containing increasing concentrations of WL and 5×10^{-4} or 3×10^{-4} M ISO respectively. The first point of the mixture curves indicates the level of the OR response to ISO alone (concentration of WL = 0). (A) A suppressive effect of WL is observed for OR1G1, and (B) a synergistic effect is observed for OR52D1.

Conversely, synergistic effects or no effect of WL on the ISO responses were primarily observed in sites where both ISO and WL strongly induced EOG signals when delivered alone (10 out of 11 synergies; 17 out of 18 that showed no effect). In conclusion, when WL induced an EOG, the combination of ISO and WL primarily

acted synergistically, or the odorants did not noticeably interact. When WL did not induce an EOG, the ISO-WL mixture primarily induced a reduction or a complete suppression of the EOG.

The suppressive influence of WL on EOG responses is illustrated in Fig. 2. As shown by the concentration–response curves (Fig. 2A) and the examples of EOG signals obtained from the same recording site (Fig. 2B), ISO delivery induced a larger response than WL delivery. This finding was observed in 75% of the cases and was expected, given the higher saturated vapour pressure of ISO than of WL. Despite the weak ability of WL to induce EOG responses when delivered alone, WL dose-dependently reduced the ISO-induced response in 40% of the observed suppressions (Table 3). Thus, WL was revealed to be very efficient at reducing the ISO-induced response and to have a concentration-dependant suppressive action. The strongest suppressive effect of WL was observed in the mixture containing the highest proportion of WL (1 volume of ISO to 10 volumes of WL). This result is interesting, given the saturated vapour pressure of WL (8.28×10^{-7} M) compared that of ISO (3.05×10^{-4} M). Thus, the addition of WL to ISO only slightly altered the stimulus concentration in terms of molarity. This efficacy of WL in interacting with the ISO response (despite the fact that WL was present in much lower quantities) may be due to a specific effect of WL on ORs. Because WL antagonises ISO stimulation despite its own weak or even absent stimulating effect, WL appears to act as a silent antagonist (Yamada & Nakatani, 2001; Sanz *et al.*, 2005). Therefore, the WL-induced suppression of the ISO-induced EOG signal would result in a decreased number of responsive ORNs and/or a decrease in the strength of their responses, culminating in a decrease in the peripheral encoding of the fruity odour.

The possibility of a synergistic action between WL and ISO is illustrated in Fig. 3. As shown in the figure, a comparison of the different curves revealed a shift of the 1/10 ISO + WL curve towards lower concentrations and an increase in EOG amplitudes induced by the mixture over the entire concentration range (ISO/WL ratio: 1/10) or for only the highest portion of the range (ISO/WL ratio: 1/1). The observed EOG responses support the hypothesis that ORNs specific to the fruity compound are potentiated by the presence of WL.

Among the 18 cases in which WL had no effect on ISO (Table 3), ISO dominated the ORN responses (Supporting Information Fig. S2). Although WL alone induced EOG responses at all concentrations, the EOG curves for ISO and ISO + WL are very similar. This finding suggests that WL and ISO encoding may be independent over their respective SVP concentration range when they are delivered alone. When delivered as a mixture, ISO clearly counteracted the effects of WL on EOG responses and was the dominant compound in the ORN recruitment process, thereby masking the encoding of the WL odour. In such cases, the encoding of the fruity odour is suppressive and completely masks the woody odour.

TABLE 3. Effects of WL on ISO EOG response

EOG responses to single odorants	Total		Effect of WL on ISO response		
	<i>n</i>	%	Suppression	Amplification	No effect
To ISO only	18	35	14	1	3
To ISO and WL delivered separately	34	65	7	10	17
Total	52		21	11	20
<i>n</i>			40	21	39
%					

The results are detailed separately for recording sites showing EOG only to ISO or to both ISO and WL delivered separately. Suppression, reduction or disappearance of ISO response in the presence of WL; amplification, increase in ISO response or synergistic action of the two odours in mixture.

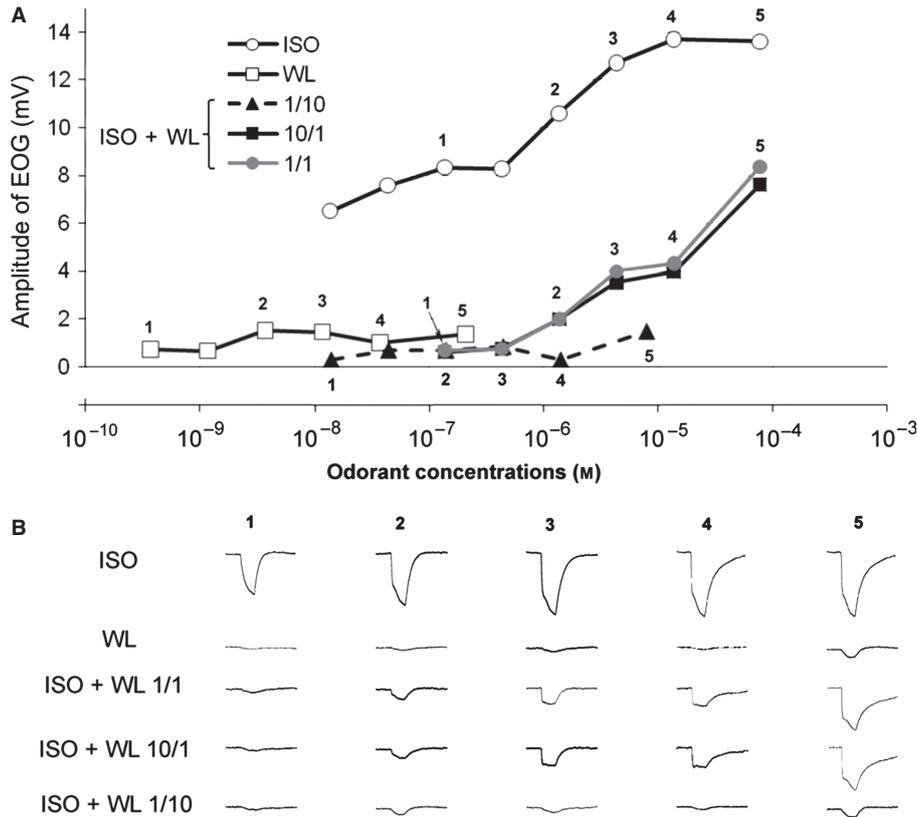


FIG. 2. (A) The concentration–response curves and (B) examples of EOG signals obtained at the same recording site depicting the suppressive action of WL in a mixture with ISO. The two odours were mixed in three different proportions (1/10, 10/1 and 1/1). In A, the numbers one to five superimposed on the curves refer to the corresponding EOG response shown in B. The strongest suppression was obtained for the mixture containing the highest proportion of WL.

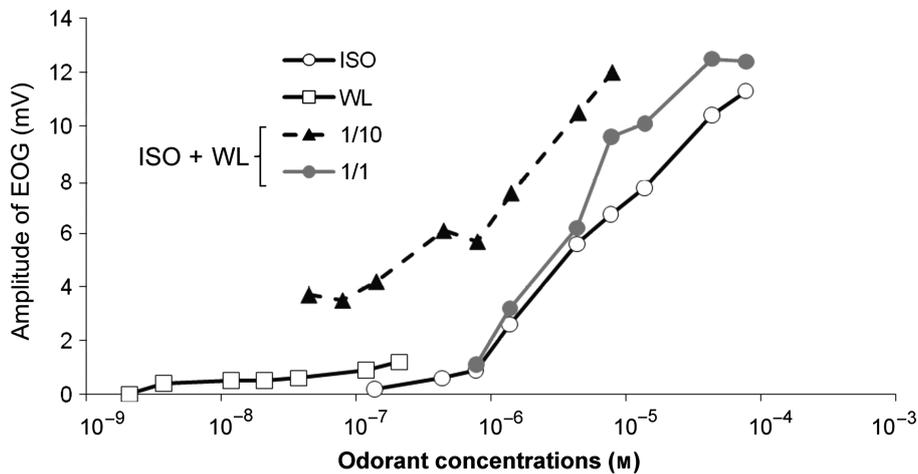


FIG. 3. The concentration–response curves of EOG recordings depicting the synergetic action of WL in a mixture with ISO. The two odours were mixed in two different proportions: 1/10 and 1/1. The strongest synergy was obtained for the mixture containing the highest proportion of WL.

Isoamyl acetate was not always the dominant contributor to the EOG responses, and ISO and WL can be encoded simultaneously (Fig. 4). As shown in this figure, the EOG signals obtained from WL reflected a high sensitivity of the recording site to that molecule. For the lowest ISO/WL ratio (1/10), the concentration–response curve has precisely the same dynamic as that obtained for WL alone, i.e., shifted toward a higher range of concentrations with the addition of ISO (Fig. 4 inset). These results suggest that at a 1/10 ratio WL is the dominant odour in the mixture, especially at concentrations below the

ISO threshold. For the ratio favouring ISO over WL (10/1) in mixtures at the lowest concentrations, the EOG amplitudes were greater than those obtained for ISO alone but the amplitudes did not surpass those obtained for WL alone or those for the low ISO concentration mixture (1/10). The threshold observed for ISO + WL at the 10/1 ratio was higher than that observed for the 1/10 ratio. This finding suggests that WL primarily supports the increase in sensitivity observed for the 1/10 ratio curve. For the 1/1 ratio, WL did not affect the dynamics of the curve with respect to the curve obtained for ISO

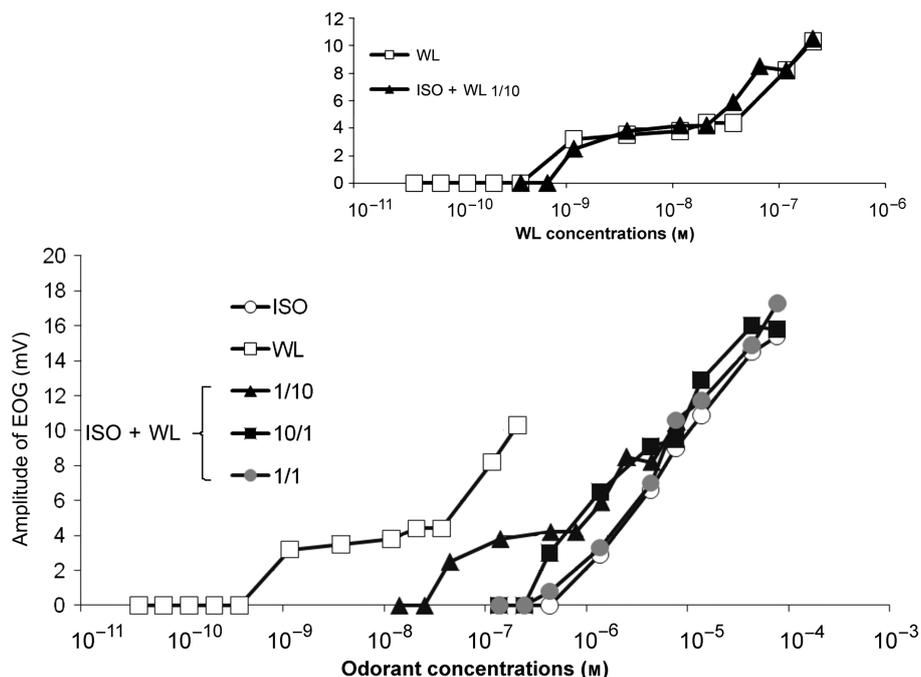


FIG. 4. The concentration–response curves of EOG recordings depicting the successive coding of WL and ISO over the concentration range. WL alone was encoded over its entire concentration range and remained encoded when in a mixture. The presence of ISO probably influences the EOG signal amplitude at the highest evaluated concentrations.

alone; ISO dominated the induced response. Therefore, for the mixture ratio favouring WL (1/10), WL is encoded despite the presence of ISO, which appears to be encoded only at much higher concentrations than those for which the dynamics of the WL responses are observed. This finding suggests that, in this case, the woody note would be perceived at lower concentrations, whereas the fruity note would dominate perception when present at the highest concentration in the mixture.

Influence of WL on ISO responses as determined by single ORN recordings

The aim of the ORN single-unit recording experiments was to study neurons that responded to both WL and ISO. The results indicate that WL is a poor stimulus for inducing an EOG response. With respect to previous data demonstrating that an olfactory stimulus that does not induce an EOG response can nonetheless influence the EOG signal obtained with a mixture in which it is present (Yamada & Nakatani, 2001; Sanz *et al.*, 2005; Duchamp-Viret *et al.*, 2003), we also recorded the ORNs which responded only to ISO. As shown in Table 4, among the 56 ISO-responding cells, three (~5%) responded to WL alone, whereas no cell was found to respond to WL and not to ISO.

In ~43% of the cases (24 of 56 ORNs), the mixture induced a suppressive effect on the ISO-induced response (Table 4, Fig. 5). This suppression was partial for 18 cells and total for six cells (i.e., extinction of the response). Figure 5 shows that stimulation with the mixture decreased the discharge frequency, revealing a partially suppressive effect. These partial suppressions lowered the strength of ORN firing, resulting in these neurons encoding the information related to the fruity molecule to a lesser degree. In 23% of the cases (13 of 56 ORNs) WL and ISO acted synergistically, whereas WL alone induced no response in 12 of the 13 cells. For example, Fig. 6 shows that the ORN responses to the ISO + WL mixtures had increased discharge frequencies relative to the responses to ISO alone and were elicited at lower concentrations (i.e., a shift in the threshold

was observed). Figures 7 and 8 show a synergy that occurred at low concentrations and resulted in a shift of the threshold value towards lower concentrations (Fig. 7). Figure 8 shows that, for the two ratios of the ISO/WL mixture, the ORN response demonstrated synergy between the two molecules at low concentrations and suppression at high concentrations. This finding indicates a concentration-tuning effect. The ORNs that did not encode for WL within a mixture appear to show a slight increase in its participation in encoding the fruity note; however, this finding was observed only for the lowest concentrations. In the remaining ORNs (~39%), the curves obtained with the mixture were identical to those obtained for ISO alone. As illustrated in Supporting Information Fig. S3, WL often elicited no activity in primary ORNs/ORs when it was presented alone. Based on these data, one might suggest that WL does not bind to ORs and, therefore, that ORNs only encode the fruity molecule.

Psychophysics

For the fruity odour (Fig. 9A), the means of the individual differences between the perceived intensities of the fruity odour when presented in a mixture and alone ($IF_m - IF_s$) were assessed by ANOVA. This analysis revealed a significant difference between the perceived intensities of the odours presented within mixtures or alone ($F_{3,36} = 19.6$, $P < 0.0001$). For a given mixture, a difference that is significantly greater than zero indicates significant synergy between the fruity odour and the mixture, and a difference that is significantly lower indicates significant masking. This conclusion is reached because the intensity of the fruity odour was perceived to be higher within the mixture than when it was presented alone. As shown in Fig. 9A, the lower concentrations of WL (ISO + WL1 and ISO + WL2) induced significant synergy between the ISO fruity odour and the mixture. For the ISO + WL3 mixture, there was no significant interaction based on the finding that the difference between the fruity intensity rated within the mixture and alone was not significantly different from zero. In

TABLE 4. Effects of WL on ISO unitary ORN responses

EOG responses to single odorants	Total		Effect of WL on ISO response		
	<i>n</i>	%	Suppression	Amplification	No effect
To ISO only	53	95	24*	12*	20
To ISO and WL delivered separately	3	5	0	1	2
Total					
<i>n</i>	56	–	24*	13*	22
%	–	–	43	23	39

Same conventions as in Table 3. *For the three ORNs responding to ISO only, both suppression and amplification were observed, which why the total of the line is 56 instead of 53; see for example Fig. 8).

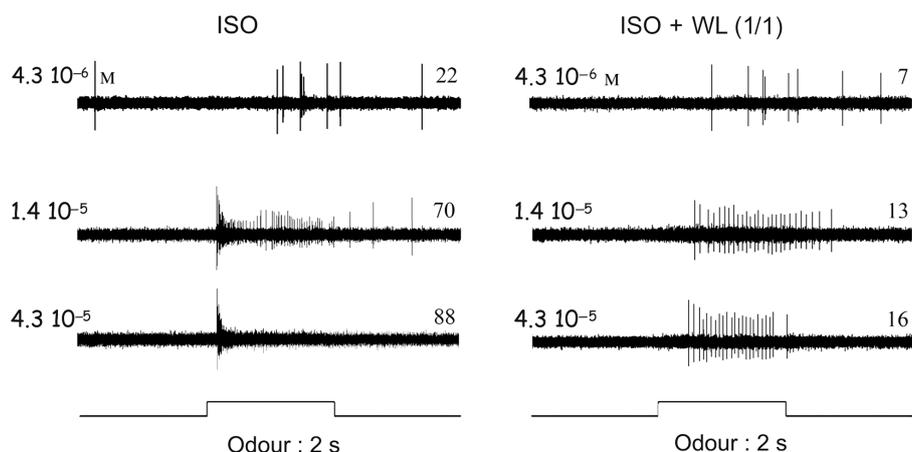


FIG. 5. An example of the suppressive action of WL on the effects of ISO as shown by single-unit responses of the same ORN to ISO alone and in combination with WL in the ratio 10/1. The odour concentrations and response firing frequencies in spikes/min are given to the left and the right of the spike traces, respectively. WL reduced the ORN firing frequency for the three examined concentrations.

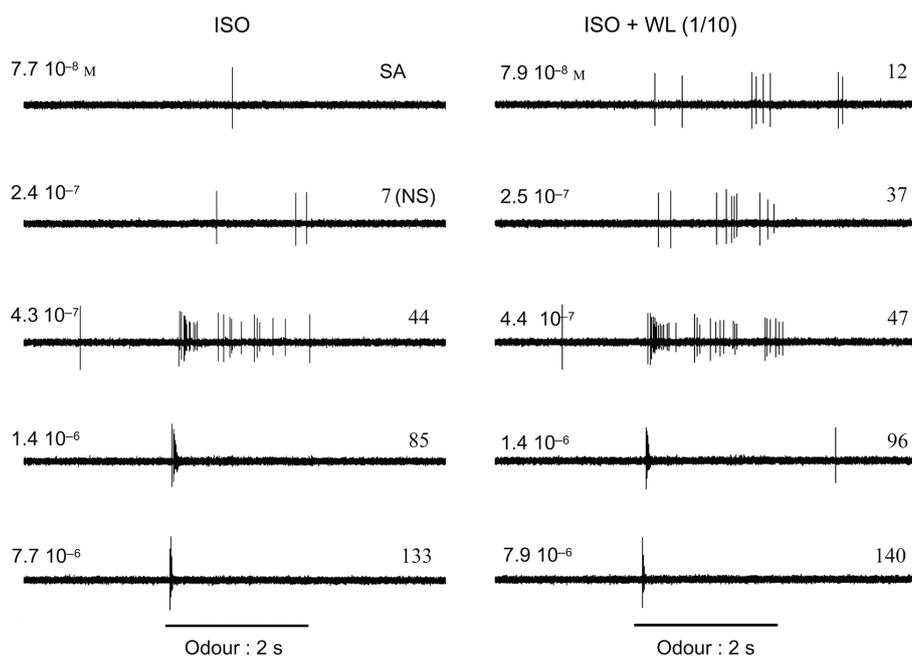


FIG. 6. An example of the synergistic action of WL on the effects of ISO as shown by single-unit responses of the same ORN to ISO alone and in combination with WL at a ratio of 1/10. WL increased the ORN firing frequency at the four concentrations examined. In response to a mixture of the two compounds, the ORN responded to lower concentrations (i.e., a gain in sensitivity) and with a stronger frequency. The odour concentrations and response firing frequencies in spikes/min are given to the left and right of the spike traces, respectively.

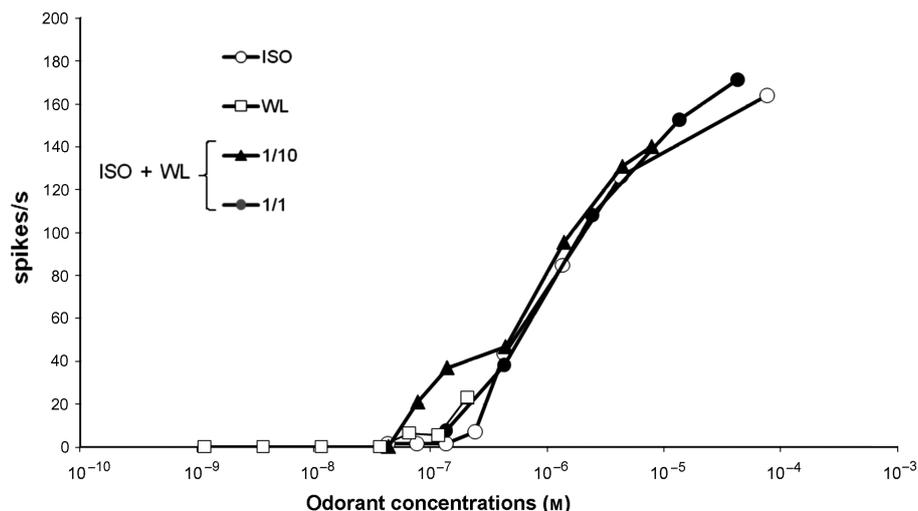


FIG. 7. The concentration–response curves of unitary ORN responses to ISO and ISO + WL mixtures, demonstrating a synergy between the effects of WL and ISO. The two odours were mixed in two different proportions: 1/10 and 1/1. The strongest synergy was obtained at low concentrations (i.e., an increase in sensitivity) for the mixture containing the highest proportion of WL.

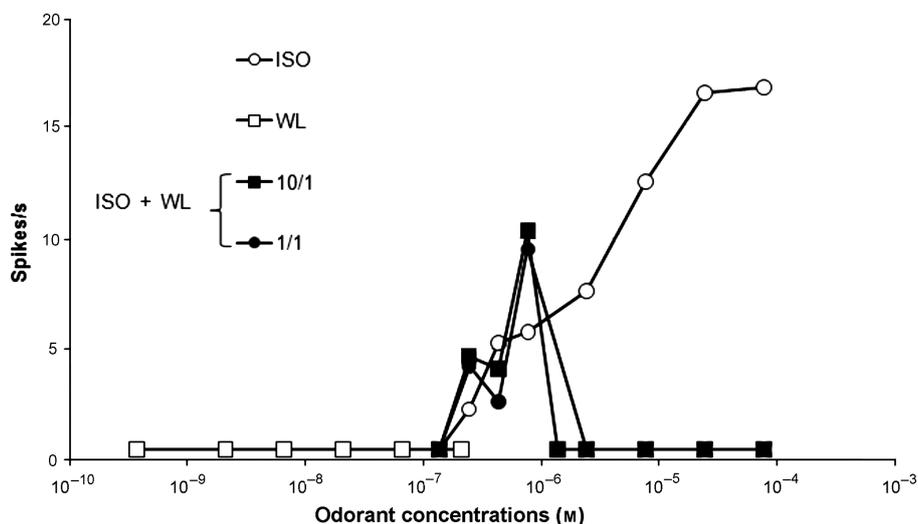


FIG. 8. Concentration–response curves of unitary ORN responses to ISO and ISO-WL mixtures, demonstrating the synergy between the effects of WL and ISO. The two odours were mixed in two different proportions: 1/10 and 1/1. Synergy was observed at the lowest concentration, whereas suppression occurred at the highest concentrations.

contrast, for the highest WL concentration (ISO + WL4), we observed significant masking of the ISO fruity odour in the mixture.

For the woody odour (Fig. 9B), the means of the individual differences between the perceived intensities of the woody odour when presented in a mixture and alone ($IW_m - IW_s$) were assessed with ANOVA. This analysis revealed a significant difference between the perceived intensities of the odours presented within mixtures or alone ($F_{3,36} = 3.0$, $P < 0.05$). Each of the concentrations of WL added to ISO, with the exception of the lowest concentration (WL1), induced a significant synergy that enhanced the perception of the woody odour within the mixture.

Discussion

Unlike the visual and auditory systems, which process information from immutable physical objects, the olfactory system tracks, detects

and discriminates between an extremely wide range of stimuli representing the moving world of odours (Bargmann, 1997). Perception of most natural odours relies on the simultaneous processing of multiple, often hundreds, of individual volatile components. Studies have shown that there is no complete independence in the perception of one odour from another when they are presented simultaneously (Kay *et al.*, 2003; Wiltrout *et al.*, 2003). It is therefore suggested that odourants are processed differently when they are presented alone or in mixtures. According to our hypothesis, the qualitative attributes of odours are primarily determined by the peripheral olfactory system. If this hypothesis is true, it would be possible to closely link odourant mixture-induced electrophysiological responses of ORs *in vitro* and ORNs *in vivo* with the perceptual responses of human subjects. The present data indicate a salient coherence between calcium imaging and electrophysiological studies. Furthermore, the results of the psychophysical experiments validate our hypothesis without excluding

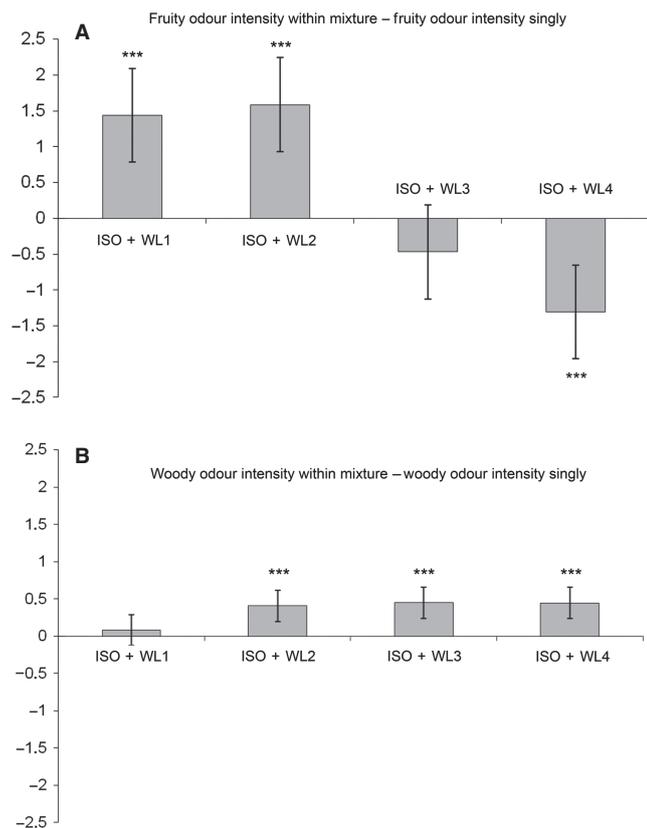


FIG. 9. (A) The mean of the individual differences between the perceived intensity of the fruity odour rated within a mixture and alone ($IF_m - IF_s$). A mean was calculated for each mixture, including ISO alone with increasing concentrations of WL (WL1 to WL4). (B) The mean of the individual differences between the perceived intensity of the woody odour rated within a mixture and alone ($IWL_m - IWL_s$). The error bars indicate the 95% confidence interval for the means ($n = 13$ subjects). Stars indicate a mean significantly different from zero, thus revealing significant synergy (positive mean) or masking (negative mean); *** $P < 0.0005$.

additional cortical processing (Grabenhorst *et al.*, 2007; Grossman *et al.*, 2008; Ishii *et al.*, 2008) that may be involved in the attribution of emotional, behavioural or other biologically or ethologically pertinent valences of an odourant stimulus.

The responses of most individual ORs/ORNs to ISO are modified in the presence of WL

Olfactory receptor neuron responses reflect the properties of the specific OR that they express, such that each ORN and its OR can be considered a single unit (Chess *et al.*, 1994; Serizawa *et al.*, 2000, 2004). ORs/ORNs have been shown to be excited by several different odourant molecules presented alone, whether or not these molecules are structurally related (Duchamp-Viret *et al.*, 1999; Malnic *et al.*, 1999; Bieri *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2005; Grosmaître *et al.*, 2009). Furthermore, when ORNs are simultaneously stimulated by different odourant molecules in binary mixtures (Duchamp-Viret *et al.*, 2003) or more complex natural stimuli (Lin *et al.*, 2006), their response reflects a partial or even complete synergistic or suppressive process (Duchamp-Viret *et al.*, 2003; Ukahanov *et al.*, 2010). Interestingly, the same phenomenon has been described at the perceptual level by psychophysical studies in which interactions between odour mixtures were commonly observed in humans (Oka *et al.*, 2004; Atanasova *et al.*, 2005; Grossman *et al.*, 2008; Miyazawa *et al.*, 2008; Wise *et al.*, 2007; Commetto-Muniz *et al.*, 2003; Laing & Glemarec, 1992).

The peripheral or central nature of these interactions has been explored (Laing & Willcox, 1987; Rouby & Holley, 1995), and it has been suggested that both are involved in mixture processing (Ishii *et al.*, 2008; Boyle *et al.*, 2009). Indeed, mixture-induced antagonistic effects have previously been described at both the peripheral and the perceptual levels (Brodin *et al.*, 2009; Spehr *et al.*, 2004). In addition, Takeuchi and co-workers (Takeuchi *et al.*, 2009) established parallels between a reduction in human perception and the blocking of CNG channels in dissociated ORNs *in vitro*. The present study is original in that it uses three experimental paradigms to establish direct links between ORs, ORNs and the cognitive events that occur during odour mixture coding. Of course, due to experimental constraints, the results of the present electrophysiological, calcium imaging and psychophysical paradigms cannot be strictly compared, especially considering the concentration ranges of the compounds. The most salient features of our electrophysiological results are (i) that the simultaneous presence of the two molecules in a mixture affects the neuronal population response (i.e., the EOG response) and (ii) that mixtures primarily result in a suppressive action of WL on ISO-induced responses. The EOG responses recorded within different turbinates sites reflect the weak power of WL to interact with ORNs. Moreover, when WL is mixed with ISO it primarily reduces the ORN response amplitude, i.e., the number and strength of the responses of the ORs/ORNs that are recruited by ISO alone. The fact that this phenomenon was shown at the EOG level suggests that activated ORNs represent a neuronal assembly that is sufficiently large to influence the global response. The present *in vitro* results confirm that WL can reduce odour-induced OR activation, as exemplified by the ORIG1 calcium response to the odourant mixture (Fig 2A). These findings also indicate that WL can synergise with ISO on the same ORs, as shown by the responses of OR52D1 to the odourant mixtures. The activation of both ORIG1 and OR52D1 by these two compounds was expected, given that these two ORs have wide response spectra (Sanz *et al.*, 2005), but other ORs may respond more specifically to these odorants. It must be noted that although ORIG1 and OR52D1 responded to common odorants, these receptors have different odourant repertoires. Furthermore, given that mammalian ORs/ORNs have broad response profiles (Duchamp-Viret *et al.*, 1999; Grosmaître *et al.*, 2009), ISO and WL may interact with different types of ORs/ORNs and/or with only one receptor type expressed in the recording zone. The impact of interactions at the EOG signal level observed in this study is in strong agreement with the results obtained by Zhao *et al.* (1998), who showed that overexpression of 17 ORs in only 20% of ORNs resulted in an approximately two-fold enhancement of the basal EOG signal amplitude in response to the OR's specific ligand, octanal. In accordance with this result, although interactions between ISO and WL were observed in only a fraction of ORNs, this effect should be sufficiently strong to be observed in EOG recordings.

The influence of one molecule on another within a mixture is not solely dependent on concentration

The strong influence of WL on ISO-induced cell responses was unexpected, especially considering the SVPs and stimulating power of the two molecules. Indeed, ISO has a 400-fold higher SVP than WL and is also known to be one of the most powerful molecules in terms of activating the olfactory system in mammals (Duchamp-Viret *et al.*, 2000). In the electrophysiological, calcium imaging and psychophysiological experiments, the use of different WL/ISO ratios consistently resulted in ISO being more concentrated in the mixture, as was previously reported in an ecological situation and with wine, in particular (Spillman, 1997).

Despite the fact that the chosen ratios always resulted in ISO being the more concentrated compound in the mixtures in the three experiments, two types of interactions between WL and ISO responses were observed *in vitro* (i.e., calcium-imaging OR activity) and *in vivo* (i.e., on ORN activity and on the perceived intensity of ISO): suppression and synergy. These results indicate that the suppressive influence of WL is not driven by its molecular concentration but rather by major differences in the binding properties of the responding ORs/ORNs. These differences may include a specific affinity of WL for certain ISO-sensitive ORs/ORNs. Whatever the underlying mechanism, the strong influence of WL on the observed ISO-induced electrophysiological and calcium imaging responses often matched the influence of the WL-related woody note on the perception of the ISO-related fruity note in human subjects. Within a mixture, WL can increase the strength of OR/ORN responses to ISO (Figs 1B, 6, 7 and 8) and enhance the perception intensity of the fruity note (Fig. 9A). Moreover, some observations (Fig. 4) lead us to propose that WL is encoded in the mixture at lower concentrations, despite the presence of ISO, relative to its delivery alone but that the effect of WL is masked by high concentrations of ISO. This result is wholly consistent with the relative stability of the perception of the woody note of WL reported in the present psychophysical experiment with respect to the presence of the fruity note of ISO in the mixture. However, the same is not true for the reverse situation. Indeed, the perceived intensity of the fruity note is decreased by high concentrations of WL (Fig. 9A). This finding is in agreement with the electrophysiological (Figs. 2, 5, and 8) and calcium imaging (Fig. 1A) results, which indicate that WL reduced or totally suppressed ISO responses. Of course, the suppression of the ISO response by WL occurred at all concentrations in our *in vivo* cellular and *in vitro* calcium imaging studies, whereas suppression occurred only for the higher concentrations of WL in the psychophysical experiments. It must be noted that the ‘higher’ concentrations in the psychophysical experiments were 5×10^{-10} M for WL and 3×10^{-8} for ISO, corresponding to the middle and low concentrations, respectively, in the electrophysiological experiments. In addition, the ‘higher’ concentration in psychophysical experiments did not have a corresponding concentration in the *in vitro* calcium imaging experiments. Indeed, in the calcium imaging experiments the odorants were in a liquid phase and their active dynamic range cannot be compared with that of odorants in the vapour phase. This illustrates the difficulty of directly comparing the results of such different experimental approaches.

Asymmetrical interactions between mixture components similar to those reported here have been previously described at the behavioural level in rats. For example, Sokolic *et al.* (2007) observed a suppressive effect in response to mixtures containing two linear aldehydes differing only in the number of carbon atoms (four or seven). Butanal was observed to exert a suppressive effect on the detection of heptanal at much lower concentrations than the concentration of heptanal that is required to suppress butanal detection. Moreover, when both butanal and heptanal were present in a binary mixture at the same concentration, rats only responded to butanal. Unlike studies of molecules with similar chemical structures, we examined ISO and WL, which are not structurally related but are members of the same chemical family. Both molecules contain seven carbon atoms, but ISO is a linear ester whereas WL is a lactone. Despite their apparent differences in molecular structure, 3-D structural similarities between these two odorants have been observed using computational molecular modelling tools (Tromelin, A. and Thomas-Danguin, T., personal communication). The finding that ORIG1 and OR52D1 responded to both WL and ISO illustrates that these compounds target common ORs. However, ORIG1 and

OR52D1 exhibit opposite effects of WL on their respective ISO-induced response suggests that the activation of the same ORs can result in the setting in motion of a different transduction pathway. This case is also observed for citral and octanol, which are known to bind I7 receptors with high affinity (Peterlin *et al.*, 2008; Reisert & Restrepo, 2009). These compounds have been shown to activate two separate transduction pathways, cAMP and PI3K, in mouse ORNs *in vitro* (Ukhanov *et al.*, 2010). In their study, Ukhanov *et al.* (2010) demonstrated that the suppressive action of citral on octanol excitatory responses was completely disrupted when the PI3K pathway was blocked. More generally, PI3K signalling has been shown to negatively regulate the cAMP pathway, thereby reducing the excitatory potential of the odorants. Indeed, blocking the PI3K pathway increases the firing frequency in response to H100 in a large number of ORNs (Spehr *et al.*, 2002). Therefore, the PI3K pathway may be partially responsible for (i) the suppressive action of WL on the ISO-induced activity reported here and, (ii) more generally, the suppressive action of one molecule on the activity induced by another, even in the absence of structural similarities (Duchamp-Viret *et al.*, 2003).

Faithful encoding of mixture components and mixture identity can be simultaneously ensured by different ORs/ORNs

Human subjects perceived WL at low concentrations (1/3000 to 1/60 of the SVP concentration) even in ISO + WL mixtures (Fig. 9B). At the peripheral olfactory cell level, this finding may be interpreted as being due to the involvement of ORs/ORNs with a high affinity for WL. However, in the electrophysiological study described here, these ORs/ORNs were not observed. This lack of detection may be because WL-specific ORs are very sparse and/or were not present in the turbinates where recordings were made. In our experiments, the low fraction of ORNs found to respond to both WL and ISO (5.5%) did not appear to be involved in the perception of WL within a mixture given that (i) ISO also bound to these receptors and (ii) the presence of WL induced an enhancement or had no effect on the ORN response to the fruity note (Figs 6, 7 and S2). Moreover, the data in Supporting Information Fig. S2 illustrate how the interaction of ORNs with both ISO and WL might encode WL in the absence of ISO or other potential ligands. More generally, given the substantial differences in the SVPs of the odorant molecules that compose natural odorants, we suggest that each ORN/OR type may have a high affinity and sensitivity for certain low-volatility molecules. This high affinity and sensitivity would then ensure their representation in the olfactory code. Among the ensemble of existing ORs/ORNs, regardless of the mixture, there would remain a set of ORs/ORNs that were unaffected by the presence of the other molecules in the mixture. Therefore, the coding of a low-vapour-pressure compound would be ensured, regardless of the mixture. Based upon this conceptual hypothesis, the numerous possible combinations of sensitivities and affinities of ORs/ORNs and of the active concentration ranges of odorants permit detection and coding of every odour quality by the olfactory system. Such properties would result in the ability of the peripheral neurons to contribute to both configural and elemental coding.

Conclusion

This original study sheds light on the peripheral cellular mechanisms that may account for (i) the observed perceptual interactions between the fruity and woody notes in wines (Atanasova *et al.*, 2004, 2005) and (ii) the subtle aromatic balance between these two notes observed for red wines (Thomas-Danguin *et al.*, 2009; Moio *et al.*, 1993). The responses to woody–fruity odorant mixtures observed here at the

single OR and ORN levels offer a direct and indisputable parallel with the perceptual interactions observed at the integrated level in humans. Fruity note perception is enhanced by low concentrations of woody odorants and decreased by high concentrations of woody odorants, and ORN responses to odorants carrying fruity and woody notes are likewise enhanced or reduced depending on the OR type and/or the concentration of the WL in the mixture. These findings provide evidence that the crucial steps of mixture coding take place first and foremost at the periphery of the olfactory system.

Supporting Information

Additional supporting information can be found in the online version of this article:

Fig. S1. The concentration–response profiles of OR1G1- and OR52D1-expressing HEK293T cells to ISO (grey bars) and WL (black bars). Ca^{2+} responses were recorded over 3 min and were reported as the percentage of responding cells normalised to those responding to 100 μ M ATP. Both ISO and WL activated the receptors in a concentration-dependent manner.

Fig. S2. The concentration–response curves of unitary ORN responses to ISO and ISO-WL mixtures, demonstrating a concentration tuning for WL and ISO. WL was clearly encoded over its entire concentration range when it was delivered singly, whereas ISO dominated in the mixtures.

Fig. S3. The concentration–response curves of unitary ORN responses to ISO delivered alone or in a mixture. These ORNs were completely non-responsive to WL.

Fig. S4. The mean of the individual perceived intensity of ISO or WL (at different concentrations) when delivered alone.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset by Wiley-Blackwell. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS, University of Lyon, IFNL, INSERM, INRA and the Burgundy Regional Council. We would like to thank L. Briand (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France) for the kind gifts of the pCMV-RhoTagOR1G1, pCMV-RhoTagOR52D1 and pcDNA3.1/HygroGx16 plasmids, H. Matsunami (Duke University Medical Center, Durham, NC, USA) for the RTP1S, RTP2 and REEP expression vectors and K. Touhara (University of Tokyo, Tokyo, Japan) for the pMyr-FLAG-Ric-8A plasmid. We are also very grateful to Christine Belloir (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France) for her assistance with calcium imaging analysis.

Abbreviations

EOG, electro-olfactogram; HEK293T, human embryonic kidney 293T (cells); IF, intensity of the fruity odour; IP3, inositol 1,4,5-triphosphate; ISO, isoamyl acetate; IW, intensity of the woody odour; OR, olfactory receptor; ORN, olfactory receptor neuron; SVP, saturated vapour pressure; WL, whiskey lactone (β -methyl- γ -octalactone).

References

Araneda, R.C., Kini, A.D. & Firestein, S. (2000) The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nat. Neurosci.*, **3**, 1248–1255.
 Araneda, R.C., Peterlin, Z., Zhang, X., Chesler, A. & Firestein, S. (2004) A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. *J. Physiol.*, **555**, 743–756.

Arctander, S. (1969) Perfume and flavor chemicals. Monclair, NJ, USA, Steffen Arctander.
 Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Langlois, D., Nicklaus, S. & Etiévant, P. (2004) Perceptual interactions between fruity and woody notes of wine. *Flavour Frag. J.*, **19**, 476–482.
 Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Chabanet, C., Langlois, D., Nicklaus, S. & Etiévant, P. (2005) Perceptual interactions in odour mixtures: odour quality in binary mixtures of woody and fruity wine odorants. *Chem. Senses*, **30**, 209–217.
 Baker, R.A. (1964) Response parameters including synergism-antagonism in aqueous odor measurement. *Ann. NY Acad. Sci.*, **116**, 495–503.
 Bargmann, C.I. (1997) Olfactory receptors, vomeronasal receptors, and the organization of olfactory information. *Cell*, **90**, 585–587.
 Bell, G.A., Laing, D.G. & Panhuber, H. (1987) Odour mixture suppression: evidence for a peripheral mechanism in human and rat. *Brain Res.*, **426**, 8–18.
 Berglund, B. & Olsson, M.J. (1993) Odor-intensity interaction in binary mixtures. *J. Exp. Psychol. Hum. Percept. Perform.*, **19**, 302–314.
 Bieri, S., Monastyrskaja, K. & Schilling, B. (2004) Olfactory receptor neuron profiling using sandalwood odorants. *Chem. Senses*, **29**, 483–487.
 Boyle, J.A., Djordjevic, J., Olsson, M.J., Lundstrom, J.N. & Jones-Gotman, M. (2009) The human brain distinguishes between single odorants and binary mixtures. *Cereb. Cortex*, **19**, 66–71.
 Breer, H. & Boekhoff, I. (1991) Odorants of the Same Odor Class Activate Different 2nd Messenger Pathways. *Chem. Senses*, **16**, 19–29.
 Brodin, M., Laska, M. & Olsson, M.J. (2009) Odor interaction between Bourgeonal and its antagonist undecanal. *Chem. Senses*, **34**, 625–630.
 Buck, L. & Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors – a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**, 175–187.
 Cabanis, J.C., Cabanis, M.T., Cheynier, V. & Teissedre, P.L. (1998) Tables de composition. In Flanzly, C. (Ed), *OEnologie–Fondements Scientifiques et Technologiques*. Lavoisier, Paris, pp. 315–336.
 Cain, W.S. & Drexler, M. (1974) Scope and evaluation of odor counteraction and masking. *Ann. NY Acad. Sci.*, **237**, 427–439.
 Cerdán, T.G., Rodríguez Mozaz, S. & Ancín Azpilicueta, C. (2002) Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and of American oak. *Food Res. Int.*, **35**, 603–610.
 Chess, A., Simon, I., Cedar, H. & Axel, R. (1994) Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell*, **78**, 823–834.
 Cometto-Muniz, J.E., Cain, W.S. & Abraham, M.H. (2003) Dose-addition of individual odorants in the odor detection of binary mixtures. *Behav. Brain Res.*, **138**, 95–105.
 Daniel, P.C., Burgess, M.F. & Derby, C.D. (1996) Responses of olfactory receptor neurons in the spiny lobster to binary mixtures are predictable using a noncompetitive model that incorporates excitatory and inhibitory transduction pathways. *J. Comp. Physiol. [A]*, **178**, 523–536.
 Duchamp, A., Revial, M.F., Holley, A. & MacLeod, P. (1974) Odor discrimination by frog olfactory receptors. *Chem. Senses*, **1**, 213–233.
 Duchamp-Viret, P., Chaput, M.A. & Duchamp, A. (1999) Odor response properties of rat olfactory receptor neurons. *Science*, **284**, 2171–2174.
 Duchamp-Viret, P., Duchamp, A. & Chaput, M. (1993) GABAergic control of odor-induced activity in the frog olfactory bulb–Electrophysiological study with picrotoxin and bicuculline. *Neuroscience*, **53**, 111–120.
 Duchamp-Viret, P., Duchamp, A. & Chaput, M.A. (2000) Peripheral odor coding in the rat and frog: quality and intensity specification. *J. Neurosci.*, **20**, 2383–2390.
 Duchamp-Viret, P., Duchamp, A. & Chaput, M.A. (2003) A Single olfactory sensory neurons simultaneously integrate the components of an odor mixture. *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 2690–2696.
 Duchamp-Viret, P., Duchamp, A. & Vigouroux, M. (1989) Amplifying role of convergence in olfactory system. *A comparative study of receptor cell and second order neuron sensitivities*. *J. Neurophysiol.*, **61**, 1085–1094.
 Gesteland, R.C. (1959) Comments on microelectrodes. *Proc. Inst. Radio Eng.*, **47**, 1856–1862.
 Godfrey, P.A., Malnic, B. & Buck, L.B. (2004) The mouse olfactory receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2156–2161.
 Grabenhorst, F., Rolls, E.T., Margot, C., da Silva, M.A. & Velazco, M.I. (2007) How pleasant and unpleasant stimuli combine in different brain regions: odor mixtures. *J. Neurosci.*, **27**, 13532–13540.
 Grosmaître, 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**, 14545–14552.
 Grossman, K.J., Mallik, A.K., Ross, J., Kay, L.M. & Issa, N.P. (2008) Glomerular activation patterns and the perception of odor mixtures. *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 2676–2685.

- Ishii, A., Roudnitzky, N., Beno, N., Bensafi, M., Hummel, T., Rouby, C. & Thomas-Danguin, T. (2008) Synergy and masking in odor mixtures: an electrophysiological study of orthonasal vs. retronasal perception. *Chem. Senses*, **33**, 553–561.
- Jobson, J.D. (1991) *Applied Multivariate Data Analysis: Volume 1: Regression and Experimental Design* (Springer Texts in Statistics), 621 pp.
- Jones, F.N. & Woskow, M.H. (1964) On the intensity of odor mixtures. *Ann. NY Acad. Sci.*, **116**, 484–494.
- Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H. & Touhara, K. (2001) Molecular bases of odor discrimination: reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J. Neurosci.*, **21**, 6018–6025.
- Kay, L.M., Lowry, C.A. & Jacobs, H.A. (2003) Receptor contributions to configural and elemental odor mixture perception. *Behav. Neurosci.*, **117**, 1108–1114.
- Kurahashi, T., Lowe, G. & Gold, G.H. (1994) Suppression of odorant responses by odorants in olfactory receptor cells. *Science*, **265**, 118–120.
- Laing, D.G. & Glemarec, A. (1992) Selective attention and the perceptual analysis of odor mixtures. *Physiol. Behav.*, **52**, 1047–1053.
- Laing, D.G. & Jinks, A.L. (2001) Psychophysical analysis of complex odor mixtures. *CHIMIA*, **55**, 413–420.
- Laing, D.G. & Willcox, M.E. (1987) An investigation of the mechanisms of odor suppression using physical and dichorhnic mixtures. *Behav. Brain Res.*, **26**, 79–87.
- Lin, D.Y., Shea, S.D. & Katz, L.C. (2006) Representation of natural stimuli in the rodent main olfactory bulb. *Neuron*, **50**, 937–949.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. & Buck, L.B. (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, **96**, 713–723.
- Matarazzo, V., Clot-Faybess, O., Marcet, B., Guiraudie-Capraz, G., Atanasova, B., Devauchelle, G., Cerutti, M., Etiévant, P. & Ronin, C. (2005) Functional characterization of two human olfactory receptors expressed in the baculovirus Sf9 insect cell system. *Chem. Senses*, **30**, 195–207.
- McClintock, T.S. & Ache, B.W. (1989) Hyperpolarizing Receptor Potentials in Lobster Olfactory Receptor Cells - Implications for Transduction and Mixture Suppression. *Chem. Senses*, **14**, 637–647.
- Michel, W.C. & Ache, B.W. (1992) Cyclic nucleotides mediate an odor-evoked potassium conductance in lobster olfactory receptor cells. *J. Neurosci.*, **12**, 3979–3984.
- Michel, W.C. & Ache, B.W. (1994) Oor-evoked inhibition in primary olfactory receptor neurons. *Chem. Senses*, **19**, 11–24.
- Michel, W.C., McClintock, T.S. & Ache, B.W. (1991) Inhibition of lobster olfactory receptor cells by an odor-activated potassium conductance. *J. Neurophysiol.*, **65**, 446–453.
- Miyazawa, T., Gallagher, M., Preti, G. & Wise, P.M. (2008) Synergistic mixture interactions in detection of perithreshold odors by humans. *Chem. Senses*, **33**, 363–369.
- Moio, L., Schlich, P., Issanchou, S., Etiévant, P. & Feuillat, M. (1993) Description of la typicité aromatique de vins de Bourgogne issus du cépage Chardonnay. *J. int. Sciences de la vie et du vin*, **27**, 179–189.
- Noe, J. & Breer, H. (1998) Functional and molecular characterization of individual olfactory neurons. *J. Neurochem.*, **71**, 2286–2293.
- Oka, Y., Omura, M., Kataoka, H. & Touhara, K. (2004) Olfactory receptor antagonism between odorants. *EMBO J.*, **23**, 120–126.
- Olson, K.S. & Derby, C.D. (1995) Inhibition of taurine and 5'AMP olfactory receptor sites of the spiny lobster *Panulirus argus* by odorant compounds and mixtures. *J. Comp. Physiol. [A]*, **176**, 527–540.
- Peterlin, Z., Li, Y., Sun, G., Shah, R., Firestein, S. & Ryan, K. (2008) The importance of odorant conformation to the binding and activation of a representative olfactory receptor. *Chem. Biol.*, **15**, 1317–1327.
- Pet'ka, J., Etiévant, P. & Callement, G. (2000) Suitability of different plastic materials for head or nose spaces short term storage. *Analysis*, **28**, 330–335.
- Reisert, J. & Restrepo, D. (2009) Molecular tuning of odorant receptors and its implication for odor signal processing. *Chem. Senses*, **34**, 535–545.
- Rospars, J.P., Lansky, P., Chaput, M. & Duchamp-Viret, P. (2008) Competitive and noncompetitive odorant interactions in the early neural coding of odorant mixtures. *J. Neurosci.*, **28**, 2659–2666.
- Rouby, C. & Holley, A. (1995) Temporal competition between odorants: effect of different time intervals on the perception of monorhnic and dichorhnic binary mixtures. *Perception*, **24**, 1083–1097.
- Sanz, G., Schlegel, C., Pernollet, J.C. & Briand, L. (2005) Comparison of odorant specificity of two human olfactory receptors from different phylogenetic classes and evidence for antagonism. *Chem. Senses*, **30**, 69–80.
- Serizawa, S., Ishii, T., Nakatani, H., Tsuboi, A., Nagawa, F., Asano, M., Sudo, K., Sakagami, J., Sakano, H., Ijiri, T., Matsuda, Y., Suzuki, M., Yamamori, T., Iwakura, Y. & Sakano, H. (2000) Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nat. Neurosci.*, **3**, 687–693.
- Serizawa, S., Miyamichi, K. & Sakano, H. (2004) One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends Genet.*, **20**, 648–653.
- Sokolic, L., Laing, D.G. & McGregor, I.S. (2007) Asymmetric suppression of components in binary aldehyde mixtures: behavioral studies in the laboratory rat. *Chem. Senses*, **32**, 191–199.
- Spehr, M., Wetzel, C.H., Hatt, H. & Ache, B.W. (2002) 3-phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons. *Neuron*, **33**, 731–739.
- Spehr, M., Schwane, K., Heilmann, S., Gisselmann, G., Hummel, T. & Hatt, H. (2004) Dual capacity of a human olfactory receptor. *Curr. Biol.*, **14**, R832–R833.
- Spillman, P.J. (1997) Oakwood contribution to wine aroma. Thesis: horticulture, Viticulture and Oenology. J Agric Food Chem, University of Adelaide, pp. 1–367.
- Takeuchi, H., Ishida, H., Hikichi, S. & Kurahashi, T. (2009) Mechanism of olfactory masking in the sensory cilia. *J. Gen. Physiol.*, **133**, 583–601.
- Thomas-Danguin, T., Ishii, A., Etiévant, P. & Antanasova, B. (2009) Le bouquet du vin: résultat d'une intégration sensorielle différente au nez et en bouche. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et œnologiques*, **132**, 53–55.
- Ukhanov, K., Corey, E.A., Brunert, D., Klasen, K. & Ache, B.W. (2010) Inhibitory odorant signaling in Mammalian olfactory receptor neurons. *J. Neurophysiol.*, **103**, 1114–1122.
- Vigouroux, M., Viret, P. & Duchamp, A. (1988) A wide concentration range olfactometer for delivery of short reproducible odor pulses. *J. Neurosci. Methods*, **24**, 57–63.
- Wiltout, C., Dogra, S. & Linstner, C. (2003) Configurational and nonconfigurational interactions between odorants in binary mixtures. *Behav. Neurosci.*, **117**, 236–245.
- Wise, P.M., Miyazawa, T., Gallagher, M. & Preti, G. (2007) Human odor detection of homologous carboxylic acids and their binary mixtures. *Chem. Senses*, **32**, 475–482.
- Yamada, H. & Nakatani, K. (2001) Odorant-induced hyperpolarization and suppression of cAMP-activated current in newt olfactory receptor neurons. *Chem. Senses*, **26**, 25–34.
- Young, J.M., Friedman, C., Williams, E.M., Ross, J.A., Tonnes-Priddy, L. & Trask, B.J. (2002) Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 535–546.
- Zhao, H. & Firestein, S. (1999) Vertebrate odorant receptors. *Cell. Mol. Life Sci.*, **56**, 647–659.
- Zhao, H. Q., Ivic, L., Otaki, J. M., Hashimoto, M., Mikoshiba, K. & Firestein, S. (1998) Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science*, **279**, 237–242.

Discussion générale et perspectives

L'ensemble des travaux présentés dans cette thèse a été réalisé dans le but de mieux appréhender les interactions périphériques induites par des mélanges binaires et de voir dans quelle mesure ces phénomènes peuvent être à l'origine des effets observés au niveau perceptif. Autrement dit, il s'agissait d'évaluer si les dimensions qualitatives, quantitatives et hédoniques des odeurs issues de mélanges binaires peuvent être interprétées en termes de mécanismes périphériques, c'est-à-dire sur la base d'interactions au niveau des RO et/ou NSO. Nous avons retenu pour cette étude trois mélanges binaires (Oct + Cit, Oct + Méth et WL + ISO) et nous avons étudié les interactions entre les constituants de chaque mélange à la fois au niveau des RO, au niveau des NSO ainsi qu'au niveau perceptif. Trois types d'expériences ont été mis en œuvre: (i) des études *in vivo* d'imagerie calcique sur des cellules transfectées par des RO humains ou de rat, (ii) des études *ex-vivo* d'enregistrement d'EOG au niveau des NSO de rat, et (iii) des études psychophysiques chez l'Homme. Dans cette discussion générale, nous tenterons faire le lien entre ces trois niveaux d'intégration du signal olfactif et nous proposerons des perspectives issues de ce travail.

Liens entre propriétés perceptives de mélanges d'odorants et phénomènes périphériques: accords et désaccords

Il a largement été démontré que l'encodage de la qualité et de l'intensité des odeurs est effectué dès la périphérie, premier relais du système olfactif (Duchamp-Viret et al., 2000 ; Duchamp et al., 1974 ; Furudono et al., 2009 ; Malnic et al., 1999 ; Nara et al., 2011). Quelques travaux suggèrent également que certains phénomènes se produisant au niveau périphérique peuvent avoir des répercussions sur les propriétés perceptives des mélanges d'odorants (Duchamp-Viret et al., 2003 ; Muench et al., 2013 ; Rospars et al., 2008). En revanche, peu d'études se sont attachées à explorer les liens entre processus périphériques et perception. Dans le cas des mélanges d'odeurs, un des seuls exemples publiés dans la littérature rapporte que les propriétés antagonistes de l'undécanal vis-à-vis de l'activation du récepteur hOR17-4 par le bourgeonal se traduisent au niveau perceptif par un masquage de l'odeur du bourgeonal (Brodin et al., 2009; Spehr et al., 2004). Nous avons donc voulu, dans le cadre de cette thèse, apporter des données complémentaires dans le but d'étayer l'hypothèse d'un lien fort entre codage périphérique des mélanges d'odorants et perception de leur odeur.

L'étude portant sur le mélange WL + ISO a mis en évidence de fortes similitudes entre les réponses des RO et des NSO et les réponses perceptives chez l'Homme pour ce mélange. Des effets de suppression et d'addition ont été observés tant au niveau périphérique qu'au niveau perceptif, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle les interactions qui se produisent au niveau des RO et des NSO jouent un rôle essentiel dans l'élaboration des caractéristiques sensorielles de ce mélange. Cette étude met clairement en évidence un continuum entre les interactions périphériques et la qualité perçue d'un mélange d'une odeur fruitée et d'une odeur boisée. Les résultats de cette étude sont en accord avec les travaux d'Atanasova et al (2005) qui ont montré des changements de qualité très rapides en fonction des proportions des composés dans ce mélange. La qualité perçue d'un mélange binaire dépend donc des proportions et des concentrations de ses constituants. Le modèle boisé/fruité étant un modèle simplifié à l'extrême de l'arôme des vins, il est intéressant de constater que les effets de masquage mis en évidence au niveau périphérique et perceptif concordent avec la diminution de la complexité du bouquet des vins trop boisés (Thomas-Danguin et al., 2009).

En ce qui concerne le mélange Oct + Méth, les résultats issus de l'étude psychophysique sont plutôt en accord avec les effets observés au niveau des NSO : l'intensité des réponses aux mélanges est supérieure à celles des composants seuls (phénomène d'addition partielle). En effet, les mesures d'EOG ont montré que la réponse des NSO aux mélanges est supérieure ou égale à celle des composantes. Les résultats qualitatifs de l'étude psychophysique indiquent de manière générale une dominance de l'odeur de l'Oct sur celle du Méth, ce qui concorde avec les résultats observés au niveau des NSO ; l'Oct active plus efficacement les NSO que le Méth au niveau du cornet Iib. Cette dominance de l'Oct sur le Méth, compatible avec le masquage de l'odeur de Méth (Burseg and de Jong, 2009), pourrait être mise à profit pour réduire les défauts aromatiques dans certains aliments comme le jus d'orange.

Par contre, ce mélange n'induit aucun effet d'hyper-addition au niveau des NSO et au niveau perceptif contrairement aux effets mis en évidence au niveau des RO que nous avons étudiés. Comme discuté dans le chapitre II (étude EOG), l'absence de lien apparent entre les réponses des RO et celles des NSO pourrait s'expliquer par un phénomène de saturation du processus de dépolarisation ou bien par des profils de réponse différents au sein de la

population neuronale. On peut noter que l'hyper-addition est un phénomène assez rare au niveau perceptif ; il semble se produire seulement dans le cas de mélanges constitués de composés odorants peu intenses (Ferreira, 2012). Sur 150 mélanges étudiés, Laing et collaborateurs ont observé des effets de synergie pour seulement trois mélanges (Laing et al., 1984).

Les résultats des travaux menés sur le mélange Oct + Cit sont un peu plus complexes à analyser. Ce mélange provoque des effets d'hypo-addition au niveau périphérique. Plus précisément, il induit des effets d'addition partielle, de compromis et de soustraction au niveau des RO en fonction des concentrations et des proportions des composés dans le mélange. Au niveau des NSO, une moyenne de l'ensemble de ces effets est observée et se traduit essentiellement par un phénomène de compromis peu marqué : les réponses aux mélanges restent proches de la composante la plus efficace. Cette loi de la plus forte composante est conservée au niveau perceptif car l'analyse quantitative montre que l'intensité du mélange est égale à l'intensité de la composante majoritaire. Toutefois, on peut remarquer que dans l'étude EOG, peu d'observations dépassent $\tau = 0,5$. Ceci peut s'expliquer par une assez forte réponse de la MO dès les plus faibles concentrations de Cit étudiées, ce qui ne permet pas d'observer les effets de l'Oct dans un mélange où ce dernier serait plus efficace. Il serait donc intéressant de tester des concentrations plus faibles de Cit pour confirmer l'hypothèse selon laquelle la loi de la plus forte composante s'applique à la MO dans le cas de ce mélange.

Une autre hypothèse qui peut être avancée pour expliquer les effets observés au niveau de la MO peut être due au fait que les mesures d'EOG ont été effectués au niveau d'un site unique. Il est possible que, comme cela a été observé lors de l'étude du mélange WL + ISO (cf Chapitre IV), des réponses différentes soient obtenues en d'autres endroits de la MO. En effet, plusieurs travaux ont montré qu'il existe une ségrégation spatiale de l'expression des RO (Ressler et al., 1993 ; Vassar et al., 1993) et que cela peut avoir des conséquences sur l'intensité des réponses de la MO à certains odorants (Scott and Brierley, 1999). Il a notamment été démontré que le récepteur de rat rI7 est fortement exprimé dans la partie ventrale du cornet IV chez le rat (Vassar et al., 1993). Il serait donc très intéressant de

poursuivre l'étude d'enregistrements d'EOG que nous avons initiée par des mesures électrophysiologiques au niveau d'autres cornets, et notamment au niveau du cornet IV. Nous pourrions ainsi comparer les résultats obtenus *in vivo* avec ceux mis en évidence *in vitro* dans les cellules HEK293 exprimant le récepteur r17. Ces études pourraient être complétées par des mesures d'activité électrique au niveau de neurones individuels (mesures unitaires) afin d'évaluer la variabilité des réponses neuronales.

L'analyse qualitative a révélé par ailleurs que l'Oct et le Cit présentent des qualités odorantes très proches de telle sorte que les sujets ont souvent confondu les odeurs de ces deux molécules. Cette confusion qualitative est un phénomène qui peut trouver son origine au niveau périphérique. On sait qu'à ce niveau, chaque odorant active un ensemble spécifique de RO/NSO, ensemble qui lui est propre et qui définit son identité (Malnic et al., 1999). Il a été montré, chez le rat, que l'Oct et le Cit activent un grand nombre de NSO, dont plusieurs sont communs aux deux molécules (Araneda et al., 2004). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'Oct et le Cit sont deux molécules proches sur le plan de leur structure chimique. Nous avons également observé que l'Oct et Cit activent tous deux les RO que nous avons étudiés (OR1G1, OR52D1, OR1A1, OR52D1 et r17) ainsi que des NSO présents dans la même zone de la MO de rat, ce qui conforte l'idée d'un chevauchement entre les deux cartes d'activation. Ce chevauchement pourrait contribuer au fait que ces deux molécules portent des notes odorantes très proches.

On peut se poser la question des conséquences de ce chevauchement potentiellement important sur les réponses induites par les mélanges. Au niveau des RO, nos résultats suggèrent que les réponses de certains RO peuvent être inhibées totalement (cas de OR1A1) ou en partie, ce qui est compatible avec la compression des intensités observée au niveau de la MO et au niveau perceptif. Il est possible que certains NSO soient « désactivés » par les mélanges, entraînant ainsi une modification des cartes d'activation propres aux composés et donc, comme nous l'avons observé, une moins bonne identification des odeurs propres de ces composés, notamment de l'Oct. Pour répondre à cette question, il serait intéressant de pouvoir comparer les combinaisons de NSO activés par les mélanges et celles activés par les molécules isolées. La technique d'imagerie calcique *in situ*, au niveau de la MO, met en évidence les réseaux neuronaux activés par des molécules odorantes (Ma and Shepherd,

2000). L'activité de plusieurs centaines de NSO peut ainsi être enregistrée simultanément. Associée aux techniques électrophysiologiques, la mise en œuvre de cette technique permettrait d'accroître nos connaissances sur le codage olfactif périphérique des mélanges.

Cas de la perception synthétique

Une des hypothèses que nous souhaitons explorer concernait l'implication des mécanismes périphériques dans la mise en place de la perception synthétique des mélanges. Pour cela, nous avons sélectionné le mélange Oct + Cit qui, selon Kay et collaborateurs, est perçu de manière synthétique chez le rat à certains ratios des deux odorants (Kay et al., 2005; Kay et al., 2003). Contrairement aux résultats obtenus chez le rat (Kay et al., 2003), aucune perception synthétique n'a été mise en évidence chez l'Homme. Par contre, des études menées précédemment dans notre unité ont montré que le mélange éthyle maltol + isobutyrate d'éthyle induit, de manière avérée, une perception synthétique chez l'Homme et l'animal. Ce type de perception dépend principalement de la composition et du ratio de concentrations des constituants dans le mélange (Barkat et al., 2012 ; Coureaud et al., 2011 ; Coureaud et al., 2009 ; Coureaud et al., 2008 ; Le Berre et al., 2008). Ces deux caractéristiques semblent conditionner le degré de fusion perceptive qui peut être engendré. Il serait donc très intéressant d'étudier les propriétés de ce modèle de mélange au niveau périphérique afin de voir dans quelle mesure les phénomènes périphériques jouent un rôle dans la mise en place d'une perception synthétique des mélanges d'odorants.

Caractère hédonique

Le caractère plaisant ou déplaisant de l'odeur apparaît comme premier facteur dans les analyses multidimensionnelles de la perception des odeurs. Ceci a conduit certains auteurs à proposer l'idée que le caractère hédonique serait en grande partie déterminé par la structure chimique des odorants (Khan et al., 2007). Cela laisserait supposer un codage spécifique de ce caractère par les RO. Aucun élément obtenu dans nos travaux ne permet d'établir un lien entre la perception hédonique des mélanges et les réponses périphériques. Néanmoins, les RO que

nous avons étudiés répondaient aux deux odorants des mélanges binaires. Or on peut estimer que si une molécule est plaisante et l'autre déplaisante, cette dichotomie résultant de caractéristiques structurales, puisse se traduire par l'activation de RO spécifiques à chaque molécule. Cette idée de RO distincts pourrait être en phase avec des observations neuroanatomiques (Fulbright et al., 1998), électrophysiologiques (Bensafi et al., 2002 ; Kline et al., 2000) et psychophysiologiques (Ehrlichman et al., 1995) qui plaident en faveur de l'existence de deux sous-systèmes neuronaux distincts dans le traitement des odeurs plaisantes et déplaisantes. (Grabenhorst et al., 2007) ont étudié comment le cerveau interprète la valeur hédonique d'un mélange sentant le jasmin et comprenant un sous-mélange plaisant et un odorant déplaisant (indole). Les auteurs ont constaté que le mélange active deux zones cérébrales distinctes. Ainsi une hypothèse que l'on pourrait poser est que l'information périphérique alimentant ces deux zones proviendrait de deux ensembles distincts de RO.

Perspectives d'études complémentaires

Pour élucider les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les effets observés au niveau des RO, il s'avère indispensable de développer des études biochimiques permettant d'obtenir des informations sur les propriétés structurales et fonctionnelles des récepteurs. De telles études sont aujourd'hui tout à fait envisageables car des travaux récents menés par l'équipe de S. Zhuang (Cook et al., 2009 ; Corin et al., 2012) ont permis de progresser de manière significative dans ce domaine. Les conditions d'expression et de solubilisation des RO dans des cellules HEK293S ont notamment été optimisées, rendant aujourd'hui possible l'étude des paramètres de liaison et de la conformation de ces protéines. La détermination des constantes d'affinité apportera des informations précieuses permettant de mieux comprendre les interactions observées dans les études fonctionnelles sur les mélanges d'odorants. Ces approches sont en cours de développement au laboratoire. Associée aux études fonctionnelles, ces études biochimiques devraient ainsi permettre de progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la première étape de la perception olfactive.

Des interactions à d'autres niveaux du traitement du signal olfactif pourraient aussi jouer un rôle dans l'encodage des mélanges d'odorants. La modulation de la perception d'un mélange peut en effet prendre place au niveau du bulbe olfactif. Une étude a montré, chez la

souris, que certains glomérules sont activés spécifiquement par des mélanges mais pas par les odorants présentés séparément (Grossman et al., 2008). Les interactions/inhibitions entre certains glomérules permettraient la formation d'un pattern propre au mélange. Ce mécanisme ferait intervenir l'inhibition glomérulaire, via les cellules péri-glomérulaires (Wiltout et al., 2003 ; Wise et al., 2007). Cependant, d'autres expériences d'imagerie récentes suggèrent une bonne conservation de l'information entre la MO et le BO (Fletcher, 2011). L'étude de l'activation des cellules bulbaires par les mélanges d'aldéhydes que nous avons utilisés permettrait de comprendre l'origine de cette divergence apparente de résultats et ainsi de mieux appréhender l'impact du traitement bulbaire sur les caractéristiques perceptives des mélanges.

Conclusion

En conclusion, les résultats issus de ces travaux témoignent que de multiples interactions peuvent avoir lieu lorsque plusieurs odorants activent les RO. Nous avons observé que les variations de la concentration et des proportions des substances odorantes en mélange peuvent produire diverses interactions qui peuvent résulter de différents mécanismes moléculaires. Ces résultats concordent de manière générale avec les données psychophysiques démontrant que l'intensité et la qualité perçue d'un mélange d'odorants n'est pas la simple juxtaposition des caractéristiques des composants. Ces observations soutiennent l'hypothèse selon laquelle les caractéristiques perceptives des mélanges proviennent, au moins en partie, de mécanismes ayant lieu dès la périphérie du système olfactif. Il est cependant fort probable que des interactions se produisent également aux étages les plus élevés du traitement de l'information olfactive par le système nerveux central, comme en témoignent les nombreuses études démontrant l'importance de l'apprentissage et d'autres facteurs cognitifs sur la perception des odeurs et des mélanges d'odeurs. L'exploration de l'ensemble de ces processus est particulièrement importante dans la perspective d'une meilleure maîtrise de la formulation des arômes et des odeurs aussi bien dans un objectif de bien-être (cosmétique, odeurs domestiques, environnement ...) que de santé publique (acceptabilité des aliments et des régimes alimentaires).

Références Bibliographique

A

- Abaffy, T., and Defazio, A. R. (2011). The location of olfactory receptors within olfactory epithelium is independent of odorant volatility and solubility. *BMC research notes* **4**, 137-137.
- Abaffy, T., Malhotra, A., and Luetje, C. W. (2007). The molecular basis for ligand specificity in a mouse olfactory receptor: a network of functionally important residues. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 1216-24.
- Ache, B. W. (2010). Odorant-Specific Modes of Signaling in Mammalian Olfaction. *Chemical Senses* **35**, 533-539.
- Alonso, S., Lopez, S., Izagirre, N., and de la Rúa, C. (2008). Overdominance in the human genome and olfactory receptor activity. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 997-1001.
- Amoore, J. E., Johnston, J. W., Jr., and Rubin, M. (1964). The stereochemical theory of odor. *Scientific American* **210**, 42-9.
- Anderson, A. K., Christoff, K., Stappen, I., Panitz, D., Ghahremani, D. G., Glover, G., Gabrieli, J. D. E., and Sobel, N. (2003). Dissociated neural representations of intensity and valence in human olfaction. *Nature Neuroscience* **6**, 196-202.
- Araneda, R. C., Kini, A. D., and Firestein, S. (2000). The molecular receptive range of an odorant receptor. *Nature Neuroscience* **3**, 1248-1255.
- Araneda, R. C., Peterlin, Z., Zhang, X., Chesler, A., and Firestein, S. (2004). A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. *Journal of Physiology-London* **555**, 743-756.
- Atanasova, B., Langlois, D., Nicklaus, S., Chabanet, C., and Etievant, P. (2004). Evaluation of olfactory intensity: Comparative study of two methods. *Journal of Sensory Studies* **19**, 307-326.
- Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Chabanet, C., Langlois, D., Nicklaus, S., and Etievant, P. (2005a). Perceptual interactions in odour mixtures: Odour quality in binary mixtures of woody and fruity wine odorants. *Chemical Senses* **30**, 209-217.
- Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Langlois, D., Nicklaus, S., Chabanet, C., and Etievant, P. (2005b). Perception of wine fruity and woody notes: influence of peri-threshold odorants. *Food Quality and Preference* **16**, 504-510.
- Avila, G., Sandoval, A., and Felix, R. (2004). Intramembrane charge movement associated with endogenous K⁺ channel activity in HEK-293 cells. *Cellular and Molecular Neurobiology* **24**, 317-330.

B

- Baird, J. C., Berglund, B., and Olsson, M. J. (1996). Magnitude estimation of perceived odor intensity: Empirical and theoretical properties. *Journal of Experimental Psychology-Human Perception and Performance* **22**, 244-255.
- Bargmann, C. I. (2006). Comparative chemosensation from receptors to ecology. *Nature* **444**, 295-301.
- Barkat, S., Le Berre, E., Coureaud, G., Sicard, G., and Thomas-Danguin, T. (2012). Perceptual blending in odor mixtures depends on the nature of odorants and human olfactory expertise. *Chemical Senses* **37**, 159-66.

- Barkat, S., Poncelet, J., Landis, B. N., Rouby, C., and Bensafi, M. (2008). Improved smell pleasantness after odor-taste associative learning in humans. *Neuroscience Letters* **434**, 108-112.
- Beites, C. L., Kawauchi, S., Crocker, C. E., and Calof, A. L. (2005). Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Experimental Cell Research* **306**, 309-316.
- Belluscio, L., and Katz, L. C. (2001). Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. *Journal of Neuroscience* **21**, 2113-2122.
- Bensafi, M., Rouby, C., Farget, V., Bertrand, B., Vigouroux, M., and Holley, A. (2002). Influence of affective and cognitive judgments on autonomic parameters during inhalation of pleasant and unpleasant odors in humans. *Neuroscience Letters* **319**, 162-166.
- Berglund, B., Berglund, U., and Lindvall, T. (1976). Psychological processing of odor mixtures. *Psychological Review* **83**, 432-441.
- Berjukow, S., Doring, F., Froschmayr, M., Grabner, M., Glossmann, H., and Hering, S. (1996). Endogenous calcium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *British Journal of Pharmacology* **118**, 748-754.
- Billig, G. M., Pal, B., Fidzinski, P., and Jentsch, T. J. (2011). Ca²⁺ activated Cl⁻ currents are dispensable for olfaction. *Nature Neuroscience* **14**, 763-U370.
- Bockaert, J., and Pin, J. P. (1998). Use of a G-protein-coupled receptor to communicate. A success during evolution. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences de Paris. Sciences de la Vie/Life Sciences* **321**, 529-551.
- Boyle, J. A., Djordjevic, J., Olsson, M. J., Lundstroem, J. N., and Jones-Gotman, M. (2009). The Human Brain Distinguishes between Single Odorants and Binary Mixtures. *Cerebral Cortex* **19**, 66-71.
- Brady, J. D., Rich, E. D., Martens, J. R., Karpen, J. W., Varnum, M. D., and Brown, R. L. (2006). Interplay between PIP3 and calmodulin regulation of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **103**, 15635-15640.
- Brand, G., and Millot, J. L. (2001). Sex differences in human olfaction: Between evidence and enigma. *Quarterly Journal of Experimental Psychology Section B-Comparative and Physiological Psychology* **54**, 259-270.
- Brand, G., Haaz, V., and Jacquot, L. (2012). Transitivity of odor preferences: constant and particularities in hedonic perception. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior* **98**, 191-197.
- Breer, H., Boekhoff, I., and Tareilus, E. (1990). Rapid kinetics of 2nd messenger formation in olfactory transduction. *Nature* **345**, 65-68.
- Briand, L., Eloit, C., Nespoulous, C., Bezirard, V., Huet, J. C., Henry, C., Blon, F., Trotier, D., and Pernollet, J. C. (2002). Evidence of an odorant-binding protein in the human olfactory mucus: location, structural characterization, and odorant-binding properties. *Biochemistry* **41**, 7241-52.
- Brodin, M., Laska, M., and Olsson, M. J. (2009). Odor Interaction between Bourgeonal and Its Antagonist Undecanal. *Chemical Senses* **34**, 625-630.
- Brossard, C., Rousseau, F., and Dumont, J.-P. (2007). Perceptual interactions between characteristic notes smelled above aqueous solutions of odorant mixtures. *Chemical Senses* **32**, 319-327.
- Buck, L., and Axel, R. (1991). A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**, 175-87.

- Buonviso, N., and Chaput, M. A. (1990). Response similarity to odors in olfactory-bulb output cells presumed to be connected to the same glomerulus- electrophysiological study using simultaneous single-unit recordings. *Journal of Neurophysiology* **63**, 447-454.
- Burseg, K. M. M., and de Jong, C. (2007). ANYL 472 - Olfactoscan: Advances in analytical techniques for off-flavor masking in foods and beverages. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **234**.
- Burseg, K., and de Jong, C. (2009). Application of the Olfactoscan method to study the ability of saturated aldehydes in masking the odor of methional. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 9086-90.
- Bush, C. F., Jones, S. V., Lyle, A. N., Minneman, K. P., Ressler, K. J., and Hall, R. A. (2007). Specificity of olfactory receptor interactions with other G protein-coupled receptors. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 19042-19051.

C

- Cain, W. S., and Drexler, M. (1974). Scope and evaluation of odor counteraction and masking. *Annals of the New York Academy Sciences* **237**, 427-39.
- Cain, W. S., Schiet, F. T., Olsson, M. J., and deWijk, R. A. (1995). Comparison of models of odor interaction. *Chemical Senses* **20**, 625-637.
- Callegari, P. 1998. Aspects conceptuels, expérimentaux et calculatoires de la qualité olfactive. Thèse. Université de Bourgogne.
- Calof, A. L., Bonnin, A., Crocker, C., Kawauchi, S., Murray, R. C., Shou, J. Y., and Wu, H. H. (2002). Progenitor cells of the olfactory receptor neuron lineage. *Microscopy Research and Technique* **58**, 176-188.
- Cenier, T., Amat, C., Litaudon, P., Garcia, S., de Micheaux, P. L., Liquet, B., Roux, S., and Buonviso, N. (2008). Odor vapor pressure and quality modulate local field potential oscillatory patterns in the olfactory bulb of the anesthetized rat. *European Journal of Neuroscience* **27**, 1432-1440.
- Chandra, S. B. C., and Singh, S. (2005). Chemosensory processing in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*: Generalization of a feeding response reveals overlapping odour representations. *Journal of Biosciences* **30**, 679-688.
- Chaput, M. A., El Mountassir, F., Atanasova, B., Thomas-Danguin, T., Le Bon, A. M., Perrut, A., Ferry, B., and Duchamp-Viret, P. (2012). Interactions of odorants with olfactory receptors and receptor neurons match the perceptual dynamics observed for woody and fruity odorant mixtures. *European Journal of Neuroscience* **35**, 584-597.
- Charlier, L., Topin, J., Ronin, C., Kim, S.-K., Goddard, W. A., III, Efremov, R., and Golebiowski, J. (2012). How broadly tuned olfactory receptors equally recognize their agonists. Human OR1G1 as a test case. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 4205-4213.
- Chen, S., Lane, A. P., Bock, R., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2000). Blocking adenylyl cyclase inhibits olfactory generator currents induced by "IP(3)-odors". *Journal of Neurophysiology* **84**, 575-80.
- Chess, A., Simon, I., Cedar, H., and Axel, R. (1994). Allelic Inactivation Regulates Olfactory Receptor Gene-Expression. *Cell* **78**, 823-834.
- Chollet, S., and Valentin, D. (2000). Expertise level and odour perception: What can we learn from red burgundy wines? *Annee Psychologique* **100**, 11-36.

- Chrea, C., Valentin, D., Sulmont-Rosse, C., Mai, H. L., Nguyen, D. H., and Abdi, H. (2004). Culture and odor categorization: agreement between cultures depends upon the odors. *Food Quality and Preference* **15**, 669-679.
- Chrea, C., Valentin, D., Sulmont-Rosse, C., Nguyen, D. H., and Abdi, H. (2005). Semantic, typicality and odor representation: a cross-cultural study. *Chemical Senses* **30**, 37-49.
- Cook, B. L., Steuerwald, D., Kaiser, L., Graveland-Bikker, J., Vanberghem, M., Berke, A. P., Herlihy, K., Pick, H., Vogel, H., and Zhang, S. G. (2009). Large-scale production and study of a synthetic G protein-coupled receptor: Human olfactory receptor 17-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **106**, 11925-11930.
- Corin, K., Pick, H., Baaske, P., Cook, B. L., Duhr, S., Wienken, C. J., Braun, D., Vogel, H., and Zhang, S. (2012). Insertion of T4-lysozyme (T4L) can be a useful tool for studying olfactory-related GPCRs. *Molecular Biosystems* **8**, 1750-1759.
- Coureaud, G., Gibaud, D., Le Berre, E., Schaal, B., and Thomas-Danguin, T. (2011). Proportion of Odorants Impacts the Configural versus Elemental Perception of a Binary Blending Mixture in Newborn Rabbits. *Chemical Senses* **36**, 693-700.
- Coureaud, G., Hamdani, Y., Schaal, B., and Thomas-Danguin, T. (2009). Elemental and configural processing of odour mixtures in the newborn rabbit. *Journal of Experimental Biology* **212**, 2525-2531.
- Coureaud, G., Thomas-Danguin, T., Le Berre, E., and Schaal, B. (2008). Perception of odor blending mixtures in the newborn rabbit. *Physiology & Behavior* **95**, 194-199.
- Courtiol, E., Amat, C., Thevenet, M., Messaoudi, B., Garcia, S., and Buonviso, N. (2011). Reshaping of Bulbar Odor Response by Nasal Flow Rate in the Rat. *Plos One* **6**.
- Crews, L., and Hunter, D. (1994). Neurogenesis in the olfactory epithelium. *Perspectives on Developmental Neurobiology* **2**, 151-161.
- Cromarty, S. I., and Derby, C. D. (1998). Inhibitory receptor binding events among the components of complex mixtures contribute to mixture suppression in responses of olfactory receptor neurons of spiny lobsters. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* **183**, 699-707.
- Cummins, T. R., Zhou, J. Y., Sigworth, F. J., Ukomadu, C., Stephan, M., Ptacek, L. J., and Agnew, W. S. (1993). Functional consequences of a Na⁺ channel mutation causing hyperkalemic periodic paralysis. *Neuron* **10**, 667-678.

D

- Debat, H., Eloit, C., Blon, F., Sarazin, B., Henry, C., Huet, J. C., Trotier, D., and Pernollet, J. C. (2007). Identification of human olfactory cleft mucus proteins using proteomic analysis. *Journal of Proteome Research* **6**, 1985-96.
- Deisig, N., Kropf, J., Vitecek, S., Pevergne, D., Rouyar, A., Sandoz, J.-C., Lucas, P., Gadenne, C., Anton, S., and Barrozo, R. (2012). Differential Interactions of Sex Pheromone and Plant Odour in the Olfactory Pathway of a Male Moth. *Plos One* **7**.
- Delgado, R., and Bacigalupo, J. (2004). Cilium-attached and excised patch-clamp recordings of odourant-activated Ca-dependent K channels from chemosensory cilia of olfactory receptor neurons. *European Journal of Neuroscience* **20**, 2975-2980.
- DeMaria, S., and Ngai, J. (2010). The cell biology of smell. *Journal of Cell Biology* **191**, 443-452.
- Ding, X., and Dahl, A. R. (2003). Olfactory mucosa: composition, enzymatic localization and metabolism. *Handbook of Olfaction and Gustation (Doty RL, ed)*, Marcel Dekker, New York. **2nd ed**, 51-73.

- Distel, H., Ayabe-Kanamura, S., Martinez-Gomez, M., Schicker, I., Kobayakawa, T., Saito, S., and Hudson, R. (1999). Perception of everyday odors - Correlation between intensity, familiarity and strength of hedonic judgement. *Chemical Senses* **24**, 191-199.
- Duchamp-Viret, P., Duchamp, A., and Chaput, M. A. (2000). Peripheral odor coding in the rat and frog: Quality and intensity specification. *Journal of Neuroscience* **20**, 2383-2390.
- Duchamp-Viret, P., Duchamp, A., and Chaput, M. A. (2003). Single olfactory sensory neurons simultaneously integrate the components of an odour mixture. *European Journal of Neuroscience* **18**, 2690-2696.
- Duchamp, A., Revial, M. F., Holley, A., and McLeod, P. (1974). Odor discrimination by frog olfactory receptors. *Chemical Senses* **1**, 213-233.
- Duchampviret, P., Duchamp, A., and Vigouroux, M. (1989). Amplifying role of convergence in olfactory system a comparative study of receptor cell and 2nd order neuron sensitivities. *Journal of Neurophysiology* **61**, 1085-1094.

E

- Ehrlichman, H., Brown, S., Zhu, J., and Warrenburg, S. (1995). Startle reflex modulation during exposure to pleasant and unpleasant odors. *Psychophysiology* **32**, 150-154.
- Eschbach, C., Vogt, K., Schmucker, M., and Gerber, B. (2011). The Similarity between Odors and Their Binary Mixtures in *Drosophila*. *Chemical Senses* **36**, 613-621.

F

- Fadool, D. A., and Ache, B. W. (1992). Plasma membrane inositol 1,4,5-triphosphate activated channels mediate signal transduction in lobster olfactory receptor neurons. *Neuron* **9**, 907-918.
- Falkner, K. C., Pinaire, J. A., Xiao, G. H., Geoghegan, T. E., and Prough, R. A. (2001). Regulation of the rat glutathione S-transferase A2 gene by glucocorticoids: Involvement of both the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Molecular Pharmacology* **60**, 611-619.
- Ferreira, V. (2012). Revisiting psychophysical work on the quantitative and qualitative odour properties of simple odour mixtures: a flavour chemistry view. Part 1: intensity and detectability. A review. *Flavour and Fragrance Journal* **27**, 124-140.
- Ferrero, D. M., and Liberles, S. D. (2010). The secret codes of mammalian scents. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine* **2**, 23-33.
- Firestein, S. (2001). How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* **413**, 211-218.
- Fletcher, M. L. (2011). Analytical Processing of Binary Mixture Information by Olfactory Bulb Glomeruli. *Plos One* **6**.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., and Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology* **63**, 1256-1272.
- Freitag, J., Ludwig, G., Andreini, I., Rössler, P., and Breer, H. (1998). Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *Journal of Comparative Physiology A* **183**, 635-50.
- Fried, H. U., Fuss, S. H., and Korsching, S. I. (2002). Selective imaging of presynaptic activity in the mouse olfactory bulb shows concentration and structure dependence of odor responses in identified glomeruli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **99**, 3222-3227.

- Frijters, J. E. R. (1987). Psychophysical models for mixtures of tastants and mixtures of odorants. *Annals of the New York Academy Sciences* **510**, 67-78.
- Fulbright, R. K., Skudlarski, P., Lacadie, C. M., Warrenburg, S., Bowers, A. A., Gore, J. C., and Wexler, B. E. (1998). Functional MR imaging of regional brain responses to pleasant and unpleasant odors. *American Journal of Neuroradiology* **19**, 1721-1726.
- Furudono, Y., Sone, Y., Takizawa, K., Hirono, J., and Sato, T. (2009). Relationship between Peripheral Receptor Code and Perceived Odor Quality. *Chemical Senses* **34**, 151-158.

G

- Gelis, L., Wolf, S., Hatt, H., Neuhaus, E. M., and Gerwert, K. (2012). Prediction of a Ligand-Binding Niche within a Human Olfactory Receptor by Combining Site-Directed Mutagenesis with Dynamic Homology Modeling. *Angewandte Chemie-International Edition* **51**, 1274-1278.
- Getchell, M. L., Chen, Y., Ding, X., Sparks, D. L., and Getchell, T. V. (1993). Immunohistochemical localization of a cytochrome P-450 isozyme in human nasal mucosa: age-related trends. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology* **102**, 368-74.
- Getchell, T. V. (1977). Analysis of intracellular recording from salamander olfactory epithelium. *Brain Research* **123**, 275-286.
- Gilad, Y., Man, O., Paabo, S., and Lancet, D. (2003). Human specific loss of olfactory receptor genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **100**, 3324-3327.
- Gimelbrant, A. A., Skaletsky, H., and Chess, A. (2004). Selective pressures on the olfactory receptor repertoire since the human-chimpanzee divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **101**, 9019-9022.
- Gimelbrant, A. A., Stoss, T. D., Landers, T. M., and McClintock, T. S. (1999). Truncation releases olfactory receptors from the endoplasmic reticulum of heterologous cells. *Journal of Neurochemistry* **72**, 2301-2311.
- Glusman, G., Bahar, A., Sharon, D., Pilpel, Y., White, J., and Lancet, D. (2000). The olfactory receptor gene superfamily: data mining, classification, and nomenclature. *Mammalian Genome* **11**, 1016-1023.
- Glusman, G., Yanai, I., Rubin, I., and Lancet, D. (2001). The complete human olfactory subgenome. *Genome Research* **11**, 685-702.
- Goblyos, A., and Ijzerman, A. P. (2011). Allosteric modulation of adenosine receptors. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1808**, 1309-1318.
- Godfrey, P. A., Malnic, B., and Buck, L. B. (2004). The mouse olfactory receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2156-61.
- Gomez-Diaz, C., Martin, F., and Alcorta, E. (2006). The Inositol 1,4,5-triphosphate kinase1 gene affects olfactory reception in *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics* **36**, 309-321.
- Gottfried, J. A., Deichmann, R., Winston, J. S., and Dolan, R. J. (2002). Functional heterogeneity in human olfactory cortex: An event-related functional magnetic resonance imaging study. *Journal of Neuroscience* **22**, 10819-10828.
- Gottfried, J. A., Winston, J. S., and Dolan, R. J. (2006). Dissociable codes of odor quality and odorant structure in human piriform cortex. *Neuron* **49**, 467-479.
- Grabenhorst, F., Rolls, E. T., Margot, C., da Silva, M. A. A. P., and Velazco, M. I. (2007). How pleasant and unpleasant stimuli combine in different brain regions: Odor mixtures. *Journal of Neuroscience* **27**, 13532-13540.

- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type-5. *Journal of General Virology* **36**, 59-72.
- Graziadei, G. A. M., and Graziadei, P. P. C. (1979). Neurogenesis and neuron regeneration in the olfactory system of mammals. Degeneration and reconstitution of the olfactory sensory neurons after axotomy. *Journal of Neurocytology* **8**, 197-213.
- Grosmaître, X., Fuss, S. H., Lee, A. C., Adipietro, K. A., Matsunami, H., Mombaerts, P., and Ma, M. H. (2009). SR1, a Mouse Odorant Receptor with an Unusually Broad Response Profile. *Journal of Neuroscience* **29**, 14545-14552.
- Grossman, K. J., Mallik, A. K., Ross, J., Kay, L. M., and Issa, N. P. (2008). Glomerular activation patterns and the perception of odor mixtures. *European Journal of Neuroscience* **27**, 2676-2685.
- Guven, S. C., and Laska, M. (2012). Olfactory Sensitivity and Odor Structure-Activity Relationships for Aliphatic Carboxylic Acids in CD-1 Mice. *Plos One* **7**.

H

- Hague, C., Hall, R. A., and Minneman, K. P. (2004). Olfactory receptor localization and function: An emerging role for GPCR heterodimerization. *Molecular Interventions* **4**, 321-322.
- Hatt, H., Gisselman, G., and Wetzel, C. (1999). Cloning, functional expression and characterization of a human olfactory receptor. *Cellular and Molecular Biology* **45**, 285-291.
- Heitman, L. H., Kleinau, G., Brussee, J., Krause, G., and Ijzerman, A. P. (2012). Determination of different putative allosteric binding pockets at the lutropin receptor by using diverse drug-like low molecular weight ligands. *Molecular and Cellular Endocrinology* **351**, 326-336.
- Heydel, J. M., Holsztynska, E. J., Legendre, A., Thiebaud, N., Artur, Y., and Le Bon, A. M. (2010). UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) in neuro-olfactory tissues: expression, regulation, and function. *Drug Metabolism Reviews* **42**, 71-94.
- Holley, A., Anton, A., Rospars, J. P. (2012). Anatomie globale et fonctionnelle des systèmes olfactifs des vertébrés et invertébrés. In: R. Salesse, and R. Gervais, eds. *Odorat et Goût: De La Neurobiologie Des Sens Chimiques Aux Applications*. Editions Quae
- Howard, J. D., Plailly, J., Grueschow, M., Haynes, J.-D., and Gottfried, J. A. (2009). Odor quality coding and categorization in human posterior piriform cortex. *Nature Neuroscience* **12**, 932-U158.
- Hummel, T., Knecht, M., and Kobal, G. (1996). Peripherally obtained electrophysiological responses to olfactory stimulation in man: Electro-olfactograms exhibit a smaller degree of desensitization compared with subjective intensity estimates. *Brain Research* **717**, 160-164.
- Huque, T., and Bruch, R. C. (1986). Odorant and guanine nucleotide stimulated phosphoinositide turnover in olfactory cilia. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **137**, 36-42.

J

- Jacquier, V., Pick, H., and Vogel, H. (2006). Characterization of an extended receptive ligand repertoire of the human olfactory receptor OR17-40 comprising structurally related compounds. *Journal of Neurochemistry* **97**, 537-544.

- Jefferis, G. (2005). Insect olfaction: A map of smell in the brain. *Current Biology* **15**, R668-R670.
- Jensen, A. A., and Spalding, T. A. (2004). Allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **21**, 407-420.
- Jiang, B., Sun, X. F., Cao, K., and Wang, R. (2002). Endogenous K-V channels in human embryonic kidney (HEK-293) cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* **238**, 69-79.
- Jinks, A., and Laing, D. G. (2001). The analysis of odor mixtures by humans: evidence for a configurational process. *Physiology & Behavior* **72**, 51-63.
- Johnson, B. A., and Leon, M. (2007). Chemotopic odorant coding in a mammalian olfactory system. *Journal of Comparative Neurology* **503**, 1-34.
- Jung, A., Lischka, F. W., Engel, J., and Schild, D. (1994). Sodium/Calcium exchanger in olfactory receptor neurons of xenopus-laevis. *Neuroreport* **5**, 1741-1744.

K

- Kadohisa, M., and Wilson, D. A. (2006). Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **103**, 15206-15211.
- Kajiya, K., Inaki, K., Tanaka, M., Haga, T., Kataoka, H., and Touhara, K. (2001). Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *Journal of Neuroscience* **21**, 6018-6025.
- Kang, J. S., and Caprio, J. (1995). In-vivo responses of single olfactory receptor neurons in the channel catfish, *Ictalurus-Punctatus*. *Journal of Neurophysiology* **73**, 172-177.
- Katada, S., Hirokawa, T., Oka, Y., Suwa, M., and Touhara, K. (2005). Structural basis for a broad but selective ligand spectrum of a mouse olfactory receptor: Mapping the odorant-binding site. *Journal of Neuroscience* **25**, 1806-1815.
- Kaupmann, K., Malitschek, B., Schuler, V., Heid, J., Froest, W., Beck, P., Mosbacher, J., Bischoff, S., Kulik, A., Shigemoto, R., Karschin, A., and Bettler, B. (1998). GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**, 683-687.
- Kay, L. M., Crk, T., and Thorngate, J. (2005). A redefinition of odor mixture quality. *Behavioral Neuroscience* **119**, 726-733.
- Kay, L. M., Lowry, C. A., and Jacobs, H. A. (2003). Receptor contributions to configural and elemental odor mixture perception. *Behavioral Neuroscience* **117**, 1108-1114.
- Keller, A., Zhuang, H., Chi, Q., Vosshall, L. B., and Matsunami, H. (2007). Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature* **449**, 468-72.
- Kerr, D. S., Von Dannecker, L. E. C., Davalos, M., Michaloski, J. S., and Malnic, B. (2008). Ric-8B interacts with G alpha olf and G gamma 13 and co-localizes with G alpha olf, G beta 1 and G gamma 13 in the cilia of olfactory sensory neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience* **38**, 341-348.
- Khan, R. M., Luk, C.-H., Flinker, A., Aggarwal, A., Lapid, H., Haddad, R., and Sobel, N. (2007). Predicting odor pleasantness from odorant structure: Pleasantness as a reflection of the physical world. *Journal of Neuroscience* **27**, 10015-10023.
- Kirschner, S., Kleineidam, C. J., Zube, C., Rybak, J., Gruenewald, B., and Roessler, W. (2006). Dual olfactory pathway in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Comparative Neurology* **499**, 933-952.
- Kline, J. P., Blackhart, G. C., Woodward, K. M., Williams, S. R., and Schwartz, G. E. R. (2000). Anterior electroencephalographic asymmetry changes in elderly women in response to a pleasant and an unpleasant odor. *Biological Psychology* **52**, 241-250.

Krautwurst, D., Yau, K. W., and Reed, R. R. (1998). Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell* **95**, 917-926.

L

- Laffort, P., and Dravnieks, A. (1982). Several models of suprathreshold quantitative olfactory interaction in humans applied to binary, ternary and quaternary mixtures. *Chemical Senses* **7**, 153-174.
- Laing, D. G., and Francis, G. W. (1989). The capacity of humans to identify odors in mixtures. *Physiology & Behavior* **46**, 809-814.
- Laing, D. G., and Jinks, A. L. (2001). Psychophysical analysis of complex odor mixtures. *Chimia* **55**, 413-420.
- Laing, D. G., Legha, P. K., Jinks, A. L., and Hutchinson, I. (2003). Relationship between molecular structure, concentration and odor qualities of oxygenated aliphatic molecules. *Chemical Senses* **28**, 57-69.
- Laing, D. G., Panhuber, H., Willcox, M. E., and Pittman, E. A. (1984). Quality and intensity of binary odor mixture. *Physiology & Behavior* **33**, 309-319.
- Lapid, H., Shushan, S., Plotkin, A., Voet, H., Roth, Y., Hummel, T., Schneidman, E., and Sobel, N. (2011). Neural activity at the human olfactory epithelium reflects olfactory perception. *Nature Neuroscience* **14**, 1455-U132.
- Laska, M., and Hudson, R. (1993). Discriminating parts from the whole-determinants of odor mixture perception in squirrel-monkeys, *saimiri-sciureus*. *Journal of Comparative Physiology a-Sensory Neural and Behavioral Physiology* **173**, 249-256.
- Launay, G., Teletchea, S., Wade, F., Pajot-Augy, E., Gibrat, J.-F., and Sanz, G. (2012). Automatic modeling of mammalian olfactory receptors and docking of odorants. *Protein Engineering Design & Selection* **25**, 377-386.
- Lazard, D., Zupko, K., Poria, Y., Nef, P., Lazarovits, J., Horn, S., Khen, M., and Lancet, D. (1991). Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase. *Nature* **349**, 790-3.
- Le Berre, E., Atanasova, B., Langlois, D., Etievant, P., and Thomas-Danguin, T. (2007). Impact of ethanol on the perception of wine odorant mixtures. *Food Quality and Preference* **18**, 901-908.
- Le Berre, E., Beno, N., Ishii, A., Chabanet, C., Etievant, P., and Thomas-Danguin, T. (2008a). Just noticeable differences in component concentrations modify the odor quality of a blending mixture. *Chemical Senses* **33**, 389-395.
- Le Berre, E., Thomas-Danguin, T., Beno, N., Coureaud, G., Etievant, P., and Prescott, J. (2008b). Perceptual processing strategy and exposure influence the perception of odor mixtures. *Chemical Senses* **33**, 193-199.
- Lesschaeve, I., and Issanchou, S. (1996). Could selection tests detect the future performance of descriptive panellists? *Food Quality and Preference* **7**, 177-183.
- Li, W., Howard, J. D., Parrish, T. B., and Gottfried, J. A. (2008). Aversive learning enhances perceptual and cortical discrimination of indiscriminable odor cues. *Science* **319**, 1842-1845.
- Li, Y. R., and Matsunami, H. (2011). Activation State of the M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Modulates Mammalian Odorant Receptor Signaling. *Science Signaling* **339**, 62-71.

- Linster, C., and Cleland, T. A. (2004). Configurational and elemental odor mixture perception can arise from local inhibition. *Journal of Computational Neuroscience* **16**, 39-47.
- Lobel, D., Jacob, M., Volkner, M., and Breer, H. (2002). Odorants of different chemical classes interact with distinct odorant binding protein subtypes. *Chemical Senses* **27**, 39-44.
- Longo, V., Citti, L., and Gervasi, P. G. (1988). Biotransformation enzymes in nasal mucosa and liver of Sprague-Dawley rats. *Toxicology Letters* **44**, 289-97.

M

- Ma, M. H., and Shepherd, G. M. (2000). Functional mosaic organization of mouse olfactory receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **97**, 12869-12874.
- Ma, M., Grosmaître, X., Iwema, C. L., Baker, H., Greer, C. A., and Shepherd, G. M. (2003). Olfactory signal transduction in the mouse septal organ. *Journal of Neuroscience* **23**, 317-24.
- Maibeche-Coisne, M., Nikonov, A. A., Ishida, Y., Jacquin-Joly, E., and Leal, W. S. (2004). Pheromone anosmia in a scarab beetle induced by in vivo inhibition of a pheromone-degrading enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **101**, 11459-64.
- Malnic, B., Godfrey, P. A., and Buck, L. B. (2004). The human olfactory receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **101**, 2584-2589.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., and Buck, L. B. (1999). Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* **96**, 713-23.
- Man, O., Gilad, Y., and Lancet, D. (2004). Prediction of the odorant binding site of olfactory receptor proteins by human-mouse comparisons. *Protein Science* **13**, 240-254.
- Mandairon, N., Poncelet, J., Bensafi, M., and Didier, A. (2009). Humans and Mice Express Similar Olfactory Preferences. *Plos One* **4**.
- Martin, C., Grenier, D., Thevenet, M., Vigouroux, M., Bertrand, B., Janier, M., Ravel, N., and Litaudon, P. (2007). fMRI visualization of transient activations in the rat olfactory bulb using short odor stimulations. *Neuroimage* **36**, 1288-1293.
- Martinez-Marcos, A. (2009). On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Progress Neurobiology* **87**, 21-30.
- Matsui, A., Go, Y., and Niimura, Y. (2010). Degeneration of Olfactory Receptor Gene Repertoires in Primates: No Direct Link to Full Trichromatic Vision. *Molecular Biology and Evolution* **27**, 1192-1200.
- Matsumoto, H., Kobayakawa, K., Kobayakawa, R., Tashiro, T., Mori, K., Sakano, H., and Mori, K. (2010). Spatial Arrangement of Glomerular Molecular-Feature Clusters in the Odorant-Receptor Class Domains of the Mouse Olfactory Bulb. *Journal of Neurophysiology* **103**, 3490-3500.
- Meierhenrich, U. J., Golebiowski, J., Fernandez, X., and Cabrol-Bass, D. (2005). From a molecule towards an odour: the molecular basis of the first olfactory steps. *Actualite Chimique* **289**, 29-40.
- Meisami, E., and Bhatnagar, K. P. (1998). Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique* **43**, 476-499.
- Menco, B. P. M., Cunningham, A. M., Qasba, P., Levy, N., and Reed, R. R. (1997). Putative odour receptors localize in cilia of olfactory receptor cells in rat and mouse: a freeze-substitution ultrastructural study. *Journal Neurocytol* **26**, 691-706.

- Mombaerts, P. (1999). Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* **286**, 707-711.
- Morales, B., Labarca, P., and Bacigalupo, J. (1995). A ciliary K⁺ conductance sensitive to charibdotoxin underlies inhibitory responses in toad olfactory receptor neurons. *FEBS Letters* **359**, 41-44.
- Moreno-Estrada, A., Casals, F., Ramirez-Soriano, A., Oliva, B., Calafell, F., Bertranpetit, J., and Bosch, E. (2008). Signatures of selection in the human olfactory receptor OR511 gene. *Molecular Biology and Evolution* **25**, 144-154.
- Mori, K., and Sakano, H. (2011). How Is the Olfactory Map Formed and Interpreted in the Mammalian Brain? *Annual Review of Neuroscience* **34**, 467-499.
- Mori, K., Nagao, H., and Yoshihara, Y. (1999). The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. *Science* **286**, 711-5.
- Mozell, M. M., Sheeche, P. R., Swieck, S. W., Kurtz, D. B., and Hornung, D. E. (1984). A parametric study of the stimulation variables affecting the magnitude of the olfactory nerve response. *Journal of General Physiology* **83**, 233-267.
- Munch, D., Schmeichel, B., Silbering, A. F., and Galizia, C. G. (2013). Weaker Ligands Can Dominate an Odor Blend due to Syntopic Interactions. *Chemical Senses* **38**, 293-304.
- Munger, S. D., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2009). Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annual Review of Physiology* **71**, 115-40.

N

- Nagashima, A., and Touhara, K. (2010). Enzymatic conversion of odorants in nasal mucus affects olfactory glomerular activation patterns and odor perception. *Journal of Neuroscience* **30**, 16391-163918.
- Nara, K., Saraiva, L. R., Ye, X., and Buck, L. B. (2011). A Large-Scale Analysis of Odor Coding in the Olfactory Epithelium. *Journal of Neuroscience* **31**, 9179-9191.
- Nei, M., Niimura, Y., and Nozawa, M. (2008). The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nature Reviews Genetics* **9**, 951-963.
- Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., and Christopoulos, A. (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological Reviews* **55**, 597-606.
- Nickell, W. T., Kleene, N. K., and Kleene, S. J. (2007). Mechanisms of neuronal chloride accumulation in intact mouse olfactory epithelium. *Journal of Physiology* **583**, 1005-20.
- Niimura, Y. (2007). Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in mammals. *Genes & Genetic Systems* **82**, 503-503.
- Niimura, Y. (2012). Olfactory Receptor Multigene Family in Vertebrates: From the Viewpoint of Evolutionary Genomics. *Current Genomics* **13**, 103-114.
- Niimura, Y., and Nei, M. (2003). Evolution of olfactory receptor genes in the human genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **100**, 12235-12240.
- Niimura, Y., and Nei, M. (2006). Evolutionary dynamics of olfactory and other chemosensory receptor genes in vertebrates. *Journal of Human Genetics* **51**, 505-517.
- Nygaard, R., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M., and Schwartz, T. W. (2009). Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends in Pharmacological Sciences* **30**, 249-259.

O

- Oka, Y., Nakamura, A., Watanabe, H., and Touhara, K. (2004a). An odorant derivative as an antagonist for an olfactory receptor. *Chemical Senses* **29**, 815-822.
- Oka, Y., Omura, M., Kataoka, H., and Touhara, K. (2004b). Olfactory receptor antagonism between odorants. *Embo Journal* **23**, 120-126.
- Okada, Y., Teeter, J. H., and Restrepo, D. (1994). Inositol 1,4,5-triphosphate-gated conductance in isolated rat olfactory neurons. *Journal of Neurophysiology* **71**, 595-602.
- Olsson, M. J. (1994). An interaction model for odor quality and intensity. *Perception & Psychophysics* **55**, 363-72.
- Olsson, M. J. (1998). An integrated model of intensity and quality of odor mixtures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **855**, 837-840.
- Ottoson, D. (1956). Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium. *Acta Physiologica Scandinavica* **35**, 1-83.

P

- Pain, F., L'Heureux, B., and Gurden, H. (2011). Visualizing odor representation in the brain: a review of imaging techniques for the mapping of sensory activity in the olfactory glomeruli. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 2689-2709.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le Trong, I., Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**, 739-745.
- Patte, F., and Laffort, P. (1979). An alternative model of olfactory quantitative interaction in binary mixtures. *Chemical Senses and Flavours* **4**, 267-274.
- Peterlin, Z., Li, Y. D., Sun, G. X., Shah, R., Firestein, S., and Ryan, K. (2008). The Importance of Odorant Conformation to the Binding and Activation of a Representative Olfactory Receptor. *Chemistry & Biology* **15**, 1317-1327.
- Pevsner, J., Sklar, P. B., and Snyder, S. H. (1986). Odorant binding protein - localization to nasal glands and secretions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **83**, 4942-4946.
- Pierce, K. L., Premont, R. T., and Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 639-650.
- Pin, J. P., Galvez, T., and Prezeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology & Therapeutics* **98**, 325-354.

R

- Raming, K., Krieger, J., Strotmann, J., Boekhoff, I., Kubick, S., Baumstark, C., and Breer, H. (1993). Cloning and expression of odorant receptors. *Nature* **361**, 353-356.
- Rawson, N. E., Gomez, G., Cowart, B., Brand, J. G., Lowry, L. D., Pribitkin, E. A., and Restrepo, D. (1997). Selectivity and response characteristics of human olfactory neurons. *Journal of Neurophysiology* **77**, 1606-1613.
- Reisert, J., and Matthews, H. R. (1998). Na⁺ dependent Ca²⁺ extrusion governs response recovery in frog olfactory receptor cells. *Journal of General Physiology* **112**, 529-535.
- Ressler, K. J., Sullivan, S. L., and Buck, L. B. (1993). A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell* **73**, 597-609.

- Restrepo, D., Miyamoto, T., Bryant, B. P., and Teeter, J. H. (1990). Odor stimuli trigger influx of calcium into olfactory neurons of the channel catfish. *Science* **249**, 1166-1168.
- Restrepo, D., Teeter, J. H., and Schild, D. (1996). Second messenger signaling in olfactory transduction. *Journal of Neurobiology* **30**, 37-48.
- Revial, M. F., Duchamp, A., and Holley, A. (1978). Odor discrimination by frog olfactory receptors - 2nd study. *Chemical Senses & Flavour* **3**, 7-21.
- Riffell, J. A., Lei, H., Christensen, T. A., and Hildebrand, J. G. (2009). Characterization and Coding of Behaviorally Significant Odor Mixtures. *Current Biology* **19**, 335-340.
- Rospars, J.-P., Lansky, P., Chaput, M., and Duchamp-Viret, P. (2008). Competitive and noncompetitive odorant interactions in the early neural coding of odorant mixtures. *Journal of Neuroscience* **28**, 2659-2666.
- Rouby, C., Thomas-Danguin, T., Sicard, G., Vigouroux, M., Jiang, T., Poitevineau, J., and Issanchou, S. 2005. Influence du contexte sémantique sur la performance d'identification d'odeurs. *Psychologie Française*. 50:225–239.
- Rovati, G. E., Capra, V., and Neubig, R. R. (2007). The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: Beyond the ground state. *Molecular Pharmacology* **71**, 959-964.
- Rubin, B. D., and Katz, L. C. (1999). Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* **23**, 499-511.

S

- Saito, H., Chi, Q., Zhuang, H., Matsunami, H., and Mainland, J. D. (2009). Odor coding by a Mammalian receptor repertoire. *Science Signaling* **2**, ra9.
- Saito, H., Kubota, M., Roberts, R. W., Chi, Q. Y., and Matsunami, H. (2004). RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* **119**, 679-691.
- Sanz, G., Schlegel, C., Pernollet, J. C., and Briand, L. (2005). Comparison of Odorant Specificity of Two Human Olfactory Receptors from Different Phylogenetic Classes and Evidence for Antagonism. *Chemical Senses* **30**, 69-80.
- Sanz, G., Thomas-Danguin, T., Hamdani, E. H., Le Poupon, C., Briand, L., Pernollet, J. C., Guichard, E., and Tromelin, A. (2008). Relationships between molecular structure and perceived odor quality of ligands for a human olfactory receptor. *Chemical Senses* **33**, 639-653.
- Savic, I. (2001). Processing of odorous signals in humans. *Brain Research Bulletin* **54**, 307-312.
- Savic, I., Gulyas, B., Larsson, M., and Roland, P. (2000). Olfactory functions are mediated by parallel and hierarchical processing. *Neuron* **26**, 735-745.
- Schild, D., and Restrepo, D. (1998). Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiological Reviews* **78**, 429-466.
- Schmiedeberg, K., Shirokova, E., Weber, H.-P., Schilling, B., Meyerhof, W., and Krautwurst, D. (2007). Structural determinants of odorant recognition by the human olfactory receptors OR1A1 and OR1A2. *Journal of Structural Biology* **159**, 400-12.
- Schwob, J. E. (2002). Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anatomical Record* **269**, 33-49.
- Scott, J. W., and Brierley, T. (1999). A functional map in rat olfactory epithelium. *Chemical Senses* **24**, 679-90.

- Scott, J. W., Brierley, T., and Schmidt, F. H. (2000). Chemical determinants of the rat electro-olfactogram. *Journal of Neuroscience* **20**, 4721-4731.
- Scott, J. W., Davis, L. M., Shannon, D., and Kaplan, C. (1996). Relation of chemical structure to spatial distribution of sensory responses in rat olfactory epithelium. *Journal of Neurophysiology* **75**, 2036-49.
- Scott, J. W., and Scott-Johnson, P. E. (2002). The electroolfactogram: a review of its history and uses. *Microscopy Research and Technique* **58**, 152-160.
- Serizawa, S., Ishii, T., Nakatani, H., Tsuboi, A., Nagawa, F., Asano, M., Sudo, K., Sakagami, J., Sakano, H., Ijiri, T., Matsuda, Y., Suzuki, M., Yamamori, T., Iwakura, Y., and Sakano, H. (2000). Mutually exclusive expression of odorant receptor transgenes. *Nature Neuroscience* **3**, 687-693.
- Serizawa, S. U., Miyamichi, K., and Sakano, H. (2004). One neuron-one receptor rule in the mouse olfactory system. *Trends in Genetics* **20**, 648-653.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., and Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb Journal* **16**, 869-871.
- Shepherd, G. M. (1972). Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb. *Physiological Reviews* **52**, 864-917.
- Shirokova, E., Schmiedeberg, K., Bedner, P., Niessen, H., Willecke, K., Raguse, J. D., Meyerhof, W., and Krautwurst, D. (2005). Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors - G protein-dependent agonism and antagonisms of odorants. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 11807-11815.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., and Gautam, N. (1991). Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808.
- Sinding, C., Thomas-Danguin, T., Crepeaux, G., Schaal, B., and Coureaud, G. (2011). Experience influences elemental and configural perception of certain binary odour mixtures in newborn rabbits. *Journal of Experimental Biology* **214**, 4171-4178.
- Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J. A., Wetzell, C. H., Zimmer, R. K., and Hatt, H. (2003). Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* **299**, 2054-2058.
- Spehr, M., Kelliher, K. R., Li, X. H., Boehm, T., Leinders-Zufall, T., and Zufall, F. (2006). Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. *Journal of Neuroscience* **26**, 1961-70.
- Spehr, M., Schwane, K., Heilmann, S., Gisselmann, G., Hummel, T., and Hatt, H. (2004). Dual capacity of a human olfactory receptor. *Current Biology* **14**, R832-3.
- Stagnetto, J., Barkat, S., Rouby, C., Landis, B. N., and Bensafi, M. (2006). Influence of learning parameters on acquisition of odor preferences in humans. *Chemical Senses* **31**, E34-E34.
- Stary, A., Suwattanasophon, C., Wolschann, P., and Buchbauer, G. (2007). Differences in (-)-citronellal binding to various odorant receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **361**, 941-945.
- Steinke, A., Meier-Stiegen, S., Drenckhahn, D., and Asan, E. (2008). Molecular composition of tight and adherens junctions in the rat olfactory epithelium and fila. *Histochemistry and Cell Biology* **130**, 339-61.
- Steullet, P., Cate, H. S., and Derby, C. D. (2000). A spatiotemporal wave of turnover and functional maturation of olfactory receptor neurons in the spiny lobster *Panulirus argus*. *Journal of Neuroscience* **20**, 3282-3294.

Szalai, B., Barkai, L., Turu, G., Szidonya, L., Varnai, P., and Hunyady, L. (2012). Allosteric interactions within the AT(1) angiotensin receptor homodimer: Role of the conserved DRY motif. *Biochemical Pharmacology* **84**, 477-485.

T

Takeuchi, H., Ishida, H., Hikichi, S., and Kurahashi, T. (2009). Mechanism of olfactory masking in the sensory cilia. *Journal of General Physiology* **133**, 583-601.

Terrillon, S., and Bouvier, M. (2004). Roles of G-protein-coupled receptor dimerization - From ontogeny to signalling regulation. *Embo Reports* **5**, 30-34.

Thiebaud, N., Da Silva, S. V., Jakob, I., Sicard, G., Chevalier, J., Menetrier, F., Berdeaux, O., Artur, Y., Heydel, J.-M., and Le Bon, A.-M. (2013). Odorant Metabolism Catalyzed by Olfactory Mucosal Enzymes Influences Peripheral Olfactory Responses in Rats. *Plos One* **8**.

Thomas-Danguin, T. (1997). Intensité olfactive de composés purs et de mélanges: Application au masquage des odeurs. *Thèse de Chimie Organique. Université Claude Bernard. Lyon.*, 220 p.

Thomas-Danguin, T., and Chastrette, M. (2002). Odour intensity of binary mixtures of odorous compounds. *Comptes Rendus Biologies* **325**, 767-772.

Thomas-Danguin, T., Ishii, A., Etievant, P., and Atanasova, B. (2009). Le bouquet du vin. Résultat d'une intégration sensorielle différente au nez et en bouche. *Revue des oenologues* **132**, 53-55.

Thomas-Danguin, T., Maîtrepierrre, E., Sigoillot, M., Briand, L., and Tromelin, A. 2012. Les molécules odorantes, sapides et trigéminales. In: R. Salesse, and R. Gervais, eds. *Odorat et Goût: De La Neurobiologie Des Sens Chimiques Aux Applications*. Editions Quae.

Thomas-Danguin, T., Rouby, C., Sicard, G., Vigouroux, M., Farget, V., Johanson, A., Bengtzon, A., Hall, G., Ormel, W., De Graaf, C., Rousseau, F., and Dumont, J. P. (2003). Development of the ETOC: A European test of olfactory capabilities. *Rhinology* **41**, 142-151.

Trotier, D., and Macleod, P. (1983). Intracellular-recordings from salamander olfactory receptor cells. *Brain Research* **268**, 225-237.

U

Uchida, N., Takahashi, Y. K., Tanifuji, M., and Mori, K. (2000). Odor maps in the mammalian olfactory bulb: domain organization and odorant structural features. *Nature Neuroscience* **3**, 1035-1043.

Ukhanov, K., Brunert, D., Corey, E. A., and Ache, B. W. (2011). Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Antagonism in Mammalian Olfactory Receptor Neurons. *Journal of Neuroscience* **31**, 273-280.

Ukhanov, K., Corey, E. A., and Ache, B. W. (2013). Phosphoinositide 3-kinase dependent inhibition as a broad basis for opponent coding in Mammalian olfactory receptor neurons. *Plos One* **8**, e61553-e61553.

Ukhanov, K., Corey, E. A., Brunert, D., Klasen, K., and Ache, B. W. (2010). Inhibitory Odorant Signaling in Mammalian Olfactory Receptor Neurons. *Journal of Neurophysiology* **103**, 1114-1122.

Ukomadu, C., Zhou, J. Y., Sigworth, F. J., and Agnew, W. S. (1992). Mul Na⁺ channels expressed transiently in human embryonic kidney cells: biochemical and biophysical and biophysical properties. *Neuron* **8**, 663-676.

V

- Vassar, R., Ngai, J., and Axel, R. (1993). Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* **74**, 309-18.
- Vidic, J., Grosclaude, J., Monnerie, R., Persuy, M. A., Badonnel, K., Baly, C., Caillol, M., Briand, L., Salesse, R., and Pajot-Augy, E. (2008). On a chip demonstration of a functional role for Odorant Binding Protein in the preservation of olfactory receptor activity at high odorant concentration. *Lab Chip* **8**, 678-88.
- Vogl, A., Noe, J., Breer, H., and Boekhoff, I. (2000). Cross-talk between olfactory second messenger pathways. *European Journal of Biochemistry* **267**, 4529-4535.
- Von Dannecker, L. E. C., Mercadante, A. F., and Malnic, B. (2005). Ric-8B, an olfactory putative GTP exchange factor, amplifies signal transduction through the olfactory-specific G-protein G alpha olf. *Journal of Neuroscience* **25**, 3793-3800.
- Von Dannecker, L. E. C., Mercadante, A. F., and Malnic, B. (2006). Ric-8B promotes functional expression of odorant receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **103**, 9310-9314.

W

- Wachowiak, M., and Cohen, L. B. (2001). Representation of odorants by receptor neuron input to the mouse olfactory bulb. *Neuron* **32**, 723-735.
- Wachowiak, M., and Cohen, L. B. (2003). Correspondence between odorant-evoked patterns of receptor neuron input and intrinsic optical signals in the mouse olfactory bulb. *Journal of Neurophysiology* **89**, 1623-1639.
- Wade, F., Espagne, A., Persuy, M. A., Vidic, J., Monnerie, R., Merola, F., Pajot-Augy, E., and Sanz, G. (2011). Relationship between homo-oligomerization of a mammalian olfactory receptor and its activation state demonstrated by bioluminescence resonance energy transfer. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 15252-15259.
- Wayman, G. A., Impey, S., and Storm, D. R. (1995). CA²⁺ inhibition of thype III adenylyl cyclase in vivo. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 21480-21486.
- Wetzel, C. H., Oles, M., Wellerdieck, C., Kuczkowiak, M., Gisselmann, G., and Hatt, H. (1999). Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus laevis* oocytes. *Journal of Neuroscience* **19**, 7426-7433.
- Whitman, M. C., and Greer, C. A. (2009). Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in Neurobiology* **89**, 162-175.
- Willhite, D. C., Nguyen, K. T., Masurkar, A. V., Greer, C. A., Shepherd, G. M., and Chen, W. R. (2006). Viral tracing identifies distributed columnar organization in the olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **103**, 12592-12597.
- Wiltrout, C., Dogra, S., and Linster, C. (2003). Configurational and nonconfigurational interactions between odorants in binary mixtures. *Behavioral Neuroscience* **117**, 236-245.

Wise, P. M., Miyazawa, T., Gallagher, M., and Preti, G. (2007). Human odor detection of homologous carboxylic acids and their binary mixtures. *Chemical Senses* **32**, 475-482.

Y

Young, J. M., Friedman, C., Williams, E. M., Ross, J. A., Tonnes-Priddy, L., and Trask, B. J. (2002). Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families. *Human Molecular Genetics* **11**, 535-546.

Yu, S. P., and Kerchner, G. A. (1998). Endogenous voltage-gated potassium channels in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Journal of Neuroscience* **52**, 612-617.

Z

Zeger, S. L., Liang, K. Y., and Albert, P. S. (1988). Models for longitudinal data: a generalized estimating equation approach. *Biometrics* **44**, 1049-60.

Zhainazarov, A. B., Spehr, M., Wetzel, C. H., Hatt, H., and Ache, B. W. (2004). Modulation of the olfactory CNG channel by PtdIns(3,4,5)P-3. *Journal of Membrane Biology* **201**, 51-57.

Zhang, X. H., De la Cruz, O., Pinto, J. M., Nicolae, D., Firestein, S., and Gilad, Y. (2007). Characterizing the expression of the human olfactory receptor gene family using a novel DNA microarray. *Genome Biology* **8** R86.

Zhang, X. M., and Firestein, S. (2002). The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nature Neuroscience* **5**, 124-133.

Zhao, H., and Firestein, S. (1999). Vertebrate odorant receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**, 647-659.

Zhao, H. Q., Ivic, L., Otaki, J. M., Hashimoto, M., Mikoshiba, K., and Firestein, S. (1998). Functional expression of a mammalian odorant receptor. *Science* **279**, 237-242.

Zhu, G. Y., Zhang, Y., Xu, H. X., and Jiang, C. (1998). Identification of endogenous outward currents in the human embryonic kidney (HEK 293) cell line. *Journal of Neuroscience Methods* **81**, 73-83.

Zhuang, H., Chien, M.-S., and Matsunami, H. (2009). Dynamic functional evolution of an odorant receptor for sex-steroid-derived odors in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A* **106**, 21247-21251.

Zou, D.-J., Chesler, A., and Firestein, S. (2009). How the olfactory bulb got its glomeruli: a just so story? *Nature Reviews Neuroscience* **10**, 611-618.

Zozulya, S., Echeverri, F., and Nguyen, T. (2001). The human olfactory receptor repertoire. *Genome Biology* **2**.

Zufall, F., and Leinders-Zufall, T. (2007). Mammalian pheromone sensing. *Current Opinion in Neurobiology* **17**, 483-489.

Annexes

**Annexe 1 : Fouzia El Mountassir, Christine Belloir, Loïc Briand, Thierry Thomas-Danguin, Anne-Marie Le Bon.
Encoding odorant mixtures by human olfactory receptors**

1 **Title**

2 Encoding odorant mixtures by human olfactory receptors

3

4

5

6 **Abbreviated title**

7 Encoding odorant mixtures by olfactory receptors

8

9

10

11 **Authors**

12 Fouzia El Mountassir^{1,2,3}, Christine Belloir^{1,2,3}, Loïc Briand^{1,2,3}, Thierry Thomas-Danguin^{1,2,3},
13 Anne-Marie Le Bon^{1,2,3}

14

15 ¹CNRS, UMR6265, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France.

16 ²INRA, UMR1324, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France.

17 ³Université de Bourgogne, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France.

18

19 **Abstract**

20 Mammals rarely encounter single olfactory stimuli in nature, but instead must extract
21 information from complex odor mixtures. However, mixtures of odorants often give rise to
22 novel perceptual qualities that are not present in the individual components. Mixture-specific
23 properties are assumed to result from interactions occurring at different stages of odor
24 processing. One primary hypothesis is that the features of odorant mixtures are determined by
25 the peripheral olfactory system, i.e., at the olfactory receptor (OR) level. Therefore, to better
26 understand the peripheral olfactory coding process, we investigated the responses of a panel
27 of four human ORs to aldehyde binary mixtures containing various ratios of either octanal
28 (Oct) and citronellal (Cit) or Oct and methional (Met). Receptor responses were measured by
29 calcium imaging using human embryonic kidney 293 (HEK293) cells co-transfected with an
30 OR and the promiscuous G protein G α 16. Receptor responses to Oct + Cit mixtures were
31 almost always found to be lower than the sum of single compound responses (hypo-addition).
32 For one OR (OR1A1), Oct was even found to extinguish the receptor response altogether,
33 suggesting strong competition mechanisms. In contrast, OR activation by Oct + Met mixtures
34 was hyper-additive. Interestingly, these results indicate that response patterns seem to depend
35 more on the nature of the odorants and the ratio in the mixture, not on the OR type. These
36 findings provide some insight into the complex phenomena that may occur during chemical
37 signal coding at the periphery of the olfactory system. These phenomena are partially
38 reconcilable with an integrated odor response, thus highlighting the major role of peripheral
39 events in the encoding of odorant mixtures.

40

41

42

43 **Introduction**

44 In the natural environment, olfactory stimuli are almost always mixtures, including many
45 different odorants at varying concentrations [1-3]. However, the processing and behavioral
46 consequences of odorant mixture perception remain poorly understood. Odorant mixtures are
47 often perceived as having a unique odor quality, i.e., it is generally difficult to distinguish the
48 individual components of the blend [4-6]. When a novel odor is perceived in the mixture, at
49 the expense of the components' other odors, the perception is referred to as configural [7,8].
50 Conversely, when the specific quality of each odorant is perceived, the mixture perception is
51 referred to as elemental [9-11]. In most psychophysical studies dealing with odor mixtures,
52 odor intensity was the primary focus, and it was found to be different for the mixture than the

53 simple arithmetic sum of the perceived intensity of each individual component [12,13]. A
54 reduction of odor intensity with respect to the complete addition, a phenomenon called hypo-
55 addition, was mainly observed, while an enhancement of odor intensity, termed hyper-
56 addition or synergism, was less commonly reported [14]. These observations suggest that
57 integrated odor perception likely results from interactions occurring at different levels in the
58 olfactory system, from the periphery to the brain [5,7]. Peripheral mechanisms have been
59 proposed to play a particularly decisive role in the processing of mixture information [15-17].

60

61 At the periphery of the olfactory system, stimuli are sampled by a large number of odorant
62 receptors (ORs) located in the cilia of olfactory sensory neurons (OSNs). Binding of odorants
63 to ORs triggers a signal transduction cascade that transforms the chemical energy of binding
64 into an electrical signal [18]. It has been demonstrated that each OSN expresses only one
65 functional OR [19], which is typically either able to respond to a large set of odorants or to a
66 relatively small number of related odorants [20-22]. Using various *in vivo* and *in vitro*
67 expression systems, studies on the activation of ORs by odorant molecules have elucidated
68 that olfactory information is based on a combinatorial code in which odorants are
69 discriminated by different sets of ORs [21,23-25]. A higher complexity of peripheral olfactory
70 coding may appear when OSNs are stimulated by odorant mixtures. Indeed,
71 neurophysiological studies in rats and other species have reported that various interactions
72 such as hypo-addition or hyper-addition occur at the OSN level, even when only two odorant
73 molecules are mixed together [26-30]. In most cases, a given type of interaction was observed
74 over the whole concentration range, but in some cases a shift to another interaction type (e.g.,
75 hypo-addition to hyper-addition) as a function of odorant concentration was reported [26,27].
76 Modeling of these data suggested that both competitive and non-competitive interactions
77 would account for the effects reported in these studies [27,31].

78

79 In rodents, a large number of OSNs has been shown to be activated by aldehydes, indicating
80 that many ORs are involved in the detection and encoding of these compounds [20,22].
81 Interestingly, approximately 40% of these OSNs were found to respond to at least two
82 different aldehydes, suggesting that interactions may occur if these OSNs are stimulated by
83 aldehyde mixtures. In an extensive study of the specific rat OR I7, Peterlin et al. [32]
84 demonstrated that a series of cyclic aldehydes, which are low agonists of I7, were able to
85 block activation of this receptor by octanal (Oct), its most potent agonist. Citral, a branched
86 unsaturated aldehyde, was also found to reduce the response of I7 to Oct [33]. At a perceptual

87 level, a few behavioral and psychophysical studies have revealed that mixtures of aldehydes
88 provide perceptual cues differently both qualitatively and quantitatively from those of single
89 compounds [17,34,35]. Thus, Oct mixed with citronellal (Cit) induced either configural or
90 elemental perception in rats, depending on the concentration ratios of the odorants [17,34]. In
91 humans, it has been described that Oct can mask the perception of Cit [36]; a masking effect
92 was also reported in mixtures containing Oct and methional (Met) [37]. Taken together, these
93 studies strongly suggest that the phenomena encountered in mixtures of aldehydes may be
94 caused by interactions occurring at the OR level.

95
96 To shed light on the processing phenomena that occur at the peripheral level when confronted
97 with odorant mixtures, we tested the hypothesis that binary mixtures of aldehydes induce
98 interactions at the OR level, which in turn contribute to behavioral responses to these
99 mixtures. To test this, we measured the calcium responses of ORs stimulated by aldehyde
100 binary mixtures using human embryonic kidney 293 (HEK293) cells that co-express an OR
101 and the promiscuous G protein $G\alpha 16$. We focused our study on two binary mixtures
102 containing either Oct and Cit (Oct + Cit mixture) or Oct and Met (Oct + Met mixture), which
103 induce different types of perception in mammals as mentioned above. Four human ORs,
104 OR1G1, OR52D1, OR1A1 and OR2W1, which have previously been shown to respond to
105 aldehydes [21,38,39], were selected for this study. We assessed the responses of these ORs to
106 single molecules as well as binary mixtures over a large range of concentrations.

107
108
109

110 **Materials and methods**

111

112 *Odorants*

113 Oct (CAS # 124-13-0), Cit (CAS # 106-23-0) and Met (CAS # 3268-49-3) were purchased
114 from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and were of the highest available
115 quality. Odorant stock solutions (100 mM) were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and
116 stored at -20°C .

117

118 *Functional expression of ORs*

119 Expression vectors containing the OR1G1 gene (pCMV-RhoTagOR1G1), the OR52D1 gene
120 (pCMV-RhoTagOR52D1) and the $G\alpha 16$ cDNA (pcDNA3.1/Hygro $G\alpha 16$) were used [38].

121 Expression vectors carrying the OR1A1 gene (pCI-OR1A1) and the OR2W1 gene (pCI-
122 OR2W1) were kindly provided by Dr. H. Matsunami (Duke University, Durham, USA)
123 through the Addgene repository (<http://www.addgene.org>). The expression vector carrying the
124 accessory protein RTP1S (pCI-RTP1S) was also provided by Dr. H. Matsunami, whereas the
125 expression vector carrying the accessory protein Ric-8A (pMyr-FLAG-Ric-8A) was a
126 generous gift by Dr. K. Touhara (University of Tokyo, Tokyo, Japan).

127 Hana3A cells, a HEK293T-derived cell line optimized for OR expression [40] and kindly
128 provided by Dr. H. Matsunami, were cultured in Minimal Essential Medium (MEM; Life
129 Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) supplemented with 10% (w/v) fetal bovine serum
130 (PAA Laboratories, Les Mureaux, France), 100 μ M Eagle's non-essential amino acids, 2 mM
131 GlutaMAX (Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) and puromycin (Sigma-Aldrich,
132 Saint-Quentin Fallavier, France). The cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere
133 containing 7.3% CO₂. Twenty-four hours prior to transfection, the cells were seeded at a
134 density of 3×10^4 cells per well in 96-well plates (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France)
135 pre-coated with polyethyleneimine (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). OR
136 expression plasmids (50 ng/well) were transfected into Hana3A cells together with
137 pcDNA3.1/HygroG α 16, pCI-RTP1S and pMyr-FLAG-Ric-8A (10 ng of each plasmid/well)
138 using Fugene HD (Promega, Charbonnières, France) according to the manufacturer's
139 instructions. In addition, to account for any potential nonspecific responses, mock
140 transfections were performed by transfecting the cells with the pCMV-RhoTag plasmid in
141 place of the OR expression plasmid and the other plasmids (pcDNA3.1 / HygroG α 16, pCI-
142 RTP1S, and pMyr-FLAG-Ric-8A). Cells were only used at less than ten passages to limit cell
143 response variability.

144 Calcium imaging experiments were performed 24 h following the transfection. After washing
145 cells with Hanks' balanced salt solution (HBSS; Life Technologies, Villebon-sur-Yvette,
146 France) containing 2 mM CaCl₂ and supplemented with 20 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)
147 piperazine-1-ethanesulfonic acid) (HBSS-HEPES-CaCl₂ buffer), cells were loaded with 5
148 μ M fura-2-AM (Molecular Probes, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette, France) and
149 0.05% (w/v) pluronic acid (Molecular Probes, Life Technologies, Villebon-sur-Yvette,
150 France) for 30 min at 37°C. Finally, the loading solution was replaced with 50 μ L of the
151 HBSS-HEPES-CaCl₂ buffer in each well. Odorants (100 μ L) were manually applied to cells
152 using a micropipette (a single concentration per well). The odorant stock solutions were
153 diluted extemporaneously in the HBSS-HEPES-CaCl₂ buffer to the appropriate
154 concentrations. The final concentration of DMSO in wells did not exceed 0.01% (v/v).

155 Calcium imaging was performed at 28°C using a Nikon TiE inverted epifluorescence
156 microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) equipped with an EMCCD camera
157 (Andor LucaR, Andor Technology, Belfast, United Kingdom) and a DG-4 illumination
158 system (Sutter Instrument, Novato, USA). The Ca²⁺ responses were recorded at 510 nm with
159 alternating excitation at 340 nm or 380 nm under 10X magnification. Images were captured
160 every second over a period of 3 min. The Nikon NIS-Elements AR software was used for data
161 acquisition and analysis. The reported Ca²⁺ response refers to the percentage of responding
162 cells normalized to those responding to the application of 100 μM ATP in a field containing
163 ~800 cells. ATP was used as a control to ensure the ability of the cells to exhibit a Ca²⁺
164 response because this molecule stimulates HEK293 cell-intrinsic purinergic receptors coupled
165 to the inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) pathway via endogenous G proteins. Odorants known
166 to activate these ORs were also used as positive controls. All measurements were made in
167 duplicate, and at least three independent experiments were performed. The properties of the
168 two mixtures were assessed in separate experiments.

169

170 *Graphical data representation*

171 Experimental data were expressed as the percentage of activated cells as a function of odorant
172 concentrations. In addition, for better visualization of interactions induced by mixtures, we
173 plotted the data on the synthetic graph [$\sigma = f(\tau)$] introduced by Patte and Laffort [41] and
174 further used by other authors [13,42,43] in psychophysical studies on binary mixtures. The
175 parameter Tau (τ) is the ratio of the cell response level (R = OR response expressed as the
176 percentage of activated cells) to compound A (or B) to the sum of cell response levels for
177 single compounds: $\tau_A = R_A/(R_A + R_B)$ or $\tau_B = R_B/(R_A + R_B)$. When $\tau = 0.5$, by analogy to iso-
178 intense mixtures in psychophysical studies, the mixture can be considered as iso-responsive
179 (i.e., $R_A = R_B$). In that case, the mixture is made of concentrations of odorant A and odorant B
180 that induce the same OR response when applied singly. The parameter Sigma (σ) accounts for
181 the cell response level to the mixture compared to the sum of cell responses to single
182 compounds: $\sigma = R_{\text{mix}}/(R_A + R_B)$. Following this representation, five regions corresponding to
183 distinct types of interactions can be delimited in the plot (Fig. 1): hyper-addition when $\sigma > 1$,
184 complete addition when $\sigma = 1$, and three subtypes of hypo-addition when $\sigma < 1$. The hypo-
185 addition subtypes are partial addition when $\max(\tau_A, \tau_B) < \sigma < 1$, compromise when $\min(\tau_A, \tau_B)$
186 $< \sigma < \max(\tau_A, \tau_B)$, subtraction when $\sigma < \min(\tau_A, \tau_B)$. Consequently, the position of the
187 experimental points in this representation reflects the quantitative interaction level.

188

189

190

191 **Results**

192 The four studied receptors (OR1G1, OR2W1, OR52D1 and OR1A1) were activated in a dose-
193 dependent manner by Oct, Cit and Met (Fig. 2). Except for Cit, responses of ORs to odorant
194 concentrations higher than 500 μ M were not tested because non-specific calcium responses
195 were induced beyond this concentration. When comparing the efficacy of these three
196 odorants, Cit was found to be the more potent molecule with up to ~30% responding cells
197 (Fig. 2A). Oct also significantly activated the four ORs with up to ~18% responding cells
198 (Fig. 2A and 2B) whereas Met elicited weaker responses (Fig. 2B).

199

200 To investigate OR activation by binary mixtures, different concentration levels of Oct were
201 mixed with different concentration levels of either Cit or Met. Overall, 25 combinations for
202 the Oct + Cit mixture and 36 combinations for the Oct + Met mixture were tested and
203 compared to the responses induced by the single odorants.

204 As shown in Fig. 3, the mixtures of Oct and Cit elicited different sub-types of hypo-addition
205 in the tested ORs, but response profiles largely depended on odorant concentrations in the
206 mixture. In OR1G1, when Oct concentration was low (0.01 mM) and Cit concentration was
207 less than 0.3 mM, responses to the mixtures were found to be higher than those induced by the
208 single odorants (Fig. 3A). For Cit concentrations higher than 0.3 mM, regardless of the Oct
209 concentration, the responses to mixtures were between the responses to single odorants. Using
210 the synthetic representation [$\sigma = f(\tau)$] (see Material and Methods) to plot the responses of cells
211 expressing OR1G1, we clearly observed that the Oct + Cit mixture induced two types of
212 interactions, compromise and partial addition, in 48% and 52% of cases, respectively (Fig.
213 3B). When $\tau < 0.5$ (low response to Oct), the mixtures were found to be in the compromise
214 area; that is, the response intensities to these mixtures are between response intensities to
215 single Oct and Cit. Conversely, when $\tau > 0.5$ (high response to Oct), the mixtures were in the
216 partial addition area, i.e., the response intensities to mixtures are higher than the response
217 intensities to single Oct and Cit, but less than the sum of the responses to each component.

218 In OR2W1 and OR52D1 (Fig. 3C-F), the Oct + Cit mixtures elicited similar patterns of
219 interaction: regardless of the odorant concentrations in the mixtures, we observed that the
220 responses of these ORs to these mixtures were mostly greater than the responses induced by
221 the single odorants, which corresponds to partial addition. In cells transfected with OR2W1

222 (Fig. 3D), a few cases of hyper-addition ($\sigma > 1$), complete addition ($\sigma = 1$) and compromise
223 ($\min(\tau_{\text{Oct}}, \tau_{\text{Cit}}) < \sigma < \max(\tau_{\text{Oct}}, \tau_{\text{Cit}})$) were observed as well. In cells expressing OR52D1 (Fig.
224 3F), compromise was also observed with some mixtures whereas response intensities of other
225 mixtures were not different from the less potent odorant (i.e., Oct).

226 Cells expressing OR1A1 exhibited a rather different response pattern. As shown in Fig. 3G-H,
227 Oct + Cit mixtures induced either subtraction or compromise (68% and 24% of cases,
228 respectively). Subtraction phenomenon, which is observed when the mixture intensity is
229 significantly below the intensities of single odorants, was induced when concentrations of Oct
230 increased in the mixture. Conversely, compromise was mainly found at low Oct
231 concentrations.

232
233 When Oct was mixed with Met (Fig. 4), the response patterns of the cells expressing the
234 different ORs were notably different from those induced by Oct + Cit mixtures.
235 Predominantly, the Oct + Met mixtures elicited responses higher than responses provoked by
236 single odorants in greater than 70% of the cases. In the [$\sigma = f(\tau)$] representation, these effects
237 correspond to hyper-addition ($\sigma > 1$). Although Met weakly activated these ORs, it can be
238 observed that mixing Oct with Met resulted in a strong increase in OR activation compared to
239 Oct alone. In cells expressing OR1G1 or OR52D1 (Fig. 4B and 4F), some cases of
240 compromise were observed when mixtures contained high concentrations of Met, whereas in
241 cells expressing OR2W1 or OR1A1 (Fig. 4D and 4H), some mixtures elicited partial addition.

242
243
244

245 **Discussion**

246 Several studies have shown that there is no complete independence in the perception of one
247 odorant from another when they are presented simultaneously in a mixture [7,13,14,17,44-
248 47]. It is therefore likely that odorants are processed differently when they stimulate the
249 olfactory system either singly or in mixtures. One main hypothesis is that features of odorant
250 mixtures are primarily determined by the peripheral olfactory system. The goal of the present
251 study was therefore to examine the coding of binary mixtures by human ORs expressed in a
252 heterologous expression system. Our results demonstrate that binary mixtures of aldehydes
253 can induce various interactions at the OR level. Indeed, we observed that OR responses to a
254 mixture of two odorants were clearly different from the responses to monomolecular odorants.
255 Moreover, the nature and the ratio of the two molecules included in the mixtures largely

256 impacted OR responses. The main phenomena induced by mixtures of Oct and Cit were
257 partial addition, compromise and subtraction, all related to a level of mixture-induced
258 interaction known as hypo-addition [12,14], whereas mixtures of Oct and Met elicited mainly
259 hyper-addition (see Fig. 1). These observations suggest that the type of interaction (hypo- or
260 hyper-response) induced at the OR level is likely more related to the mixture (i.e., the nature
261 of combined odorants) than to the OR itself.

262

263 *Peripheral interactions may originate from multiple underlying mechanisms*

264 The variety of response patterns observed in this study suggests that complex biological
265 mechanisms can take place at the OR level when coding an incoming chemical signal. The
266 mixture's response ranges from a drastic reduction in OR response (subtraction), suggesting a
267 competition between the two molecules, to hyper-addition, indicating synergy between the
268 two odorants to activate the receptor.

269 Hypo-addition, observed when ORs were stimulated by the Oct + Cit mixture, could be the
270 result of several types of mechanisms occurring at the level of the receptor binding site.
271 Partial addition was observed in OR2W1 and OR52D1, which were similarly activated by
272 Oct, but showed contrasting responses to Cit (e.g., Cit activated OR2W1 more strongly than
273 OR52D1). OR response is mostly driven by the strongest component of the mixture, which is
274 the more efficient OR activating component (i.e., the odorant that is more concentrated and/or
275 has a higher affinity for the OR). In that case, competition between the two molecules is
276 rather weak. Thus, schematically, for OR2W1 in which Cit can be considered as the strongest
277 ligand, the mixture's response was matched with the response to this ligand at a low Oct ratio,
278 whereas at a higher ratio, Oct also contributes to the OR response. In OR52D1, which is
279 similarly activated by both ligands, the OR response to mixtures followed the Cit response at
280 a low ratio of Oct in the mixture, whereas this OR responded as if Oct was alone in high Oct
281 mixture ratios.

282 Hypo-addition was more pronounced when OR1G1 was activated by the Oct + Cit mixtures.
283 If, at higher Oct ratios, OR response to the mixture was driven by Oct, the OR response for a
284 low Oct ratio is significantly altered by this ligand. Indeed, compromise was systematically
285 observed at these ratios. In this case, although Cit is a good agonist for OR1G1, OR response
286 is lower for mixtures containing high concentrations of Cit and low concentrations of Oct
287 compared to OR1G1 response to Cit. This effect could result from competition between
288 ligands for the same recognition site or for recognition sites that overlap on the receptor
289 macromolecule. This mechanism, which is called syntopic interaction [48], has recently been

290 proposed by Rospars et al. [27] and Münch et al. [29] to explain some of the effects induced
291 by odorant mixtures at the OSN level in mammals and insects.

292 In OR1A1, Oct can be considered a poor activating ligand compared to Cit. This is most
293 clearly demonstrated in Fig. 3H in which $\tau(\text{Oct})$ hardly ever exceeds 0.5. In this case, as soon
294 as Oct was added to the mixture at a concentration exceeding 0.1 mM, the OR response
295 decreased and was completely extinguished (subtraction). The subtraction effect observed in
296 OR1A1 when Oct and Cit were mixed indicates that increasing the concentration of two
297 OR1A1 ligands can induce strong competition mechanisms at the binding site of the OR,
298 which results in blocked OR activation. Subtraction-like effects have been observed at the
299 OR/OSN level by odorants acting as antagonists [33,49,50]. In a series of comprehensive
300 studies aimed at investigating molecular determinants of OSN activation by aldehydes,
301 compounds with poor or no activity, such as cyclic aldehydes, citral and geranial, were found
302 to antagonize activation of the rat receptor I7 by Oct [20,32,33]. In contrast, in other rat OSNs
303 that respond to Oct, geranial exhibited additive effects or only slight reduction [20], which
304 emphasizes differences in the pharmacology of ORs.

305
306 Concerning Oct and Met mixtures, the patterns of responses were mostly hyper-additive
307 regardless of the OR. Interestingly, these two ligands activated all ORs similarly with the
308 exception of OR1G1, which is much more activated by Oct (see Fig. 4B, in which $\tau(\text{Oct})$ was
309 always higher than 0.5). A few cases of hypo-addition were also observed for OR52D1, but
310 only for the highest concentrations of Met within the mixture. Hyper-addition, and to some
311 extent partial addition, would result from non-competitive mechanisms. In this situation, the
312 two molecules do not counteract each other in binding processes but act in positive
313 cooperation. This type of phenomenon would lead to a slight change in the receptor
314 conformation (allosteric transition) that may change the receptor affinity for the substrate or
315 the response efficacy. Such mechanisms can be explained by the presence of multiple binding
316 sites in the orthosteric binding pocket of the receptor or by the binding of a compound to an
317 allosteric site. Research over the past 15 years has revealed that Family A G protein-coupled
318 receptors (GPCRs) are prone to allosteric modulation. Using certain receptors as prototypical
319 models, structure-function studies have localized common allosteric sites to domains
320 comprising the second and third extracellular loops, as well as the top of transmembrane
321 domain TM7 [51]. It has also been demonstrated that molecules acting as allosteric
322 modulators can bind within the transmembrane helix domain of Family A GPCRs, such as the
323 human A₃ adenosine or the lutropin receptors [52,53].

324

325 *Molecular bases for modulation of OR activity by odorant mixtures*

326 By combining molecular modeling approaches with site-directed mutagenesis, research
327 groups have succeeded in identifying ligand-docking positions that are important for
328 activation of some human ORs [39,54-56]. Odorant binding to OR1G1 was shown to be
329 dominated by hydrophobic contacts that favor multiple binding modes through opportunistic
330 interactions [55]. This feature would allow for the binding of several types of odorants.
331 However, OR1G1 agonists would bind in very different ways according to their functional
332 groups. Regarding aldehyde ligands such as Oct, the carbonyl group is thought to form a
333 strong electrostatic interaction with the specific amino acid Lys80 [56]. A number of putative
334 key amino acids located within the transmembrane domains TM2-7 have also been identified
335 in the receptor OR1A1 and the involvement of some of them in Cit binding has been
336 demonstrated experimentally [39,57]. More generally, it has been proposed that ligands bind
337 at varying depths in the main ligand-binding pocket of GPCR, with some binding very deeply
338 and others more superficially [58]. The outcomes of these studies suggest that odorants can
339 bind at various positions in the binding pocket of ORs, which provides for a variety of
340 opportunities for odorant interactions.

341 A growing body of biochemical and biophysical evidence indicates that GPCRs can form both
342 homodimers and heterodimers. GPCR dimerization could play an important role at different
343 stages of the GPCR life cycle, including activation and signal transduction [59]. In a recent
344 study, Wade et al. [60] presented evidence for the homodimerization of the human receptor
345 OR17-40 and demonstrated that ligand binding causes conformational changes in the dimer.
346 Interestingly, they observed that high odorant concentrations strongly affect the functionality
347 of this OR, likely by promoting an inactive state of the dimer. These findings suggest that
348 ligand-mediated rearrangement of the dimer could affect receptor pharmacology similar to an
349 allosteric modulator by eliciting either positive or negative cooperativity. Indeed, the
350 propensity of GPCRs to dimerize might offer opportunities for allosteric modulation at the
351 quaternary level [61]. This phenomenon has been demonstrated extensively for Family C
352 GPCRs and this concept is gaining recognition in Family A GPCRs, such as the human
353 dopamine D2 receptor or the angiotensin receptor [62-64]. The functional consequences of
354 dimerization on OR responses to odorant mixtures remains to be elucidated. In addition, other
355 mechanisms could potentially regulate the response of OSNs to odorant mixtures. Blockage of
356 cyclic nucleotide-gated ion channels or activation of the phosphoinositide 3-kinase-dependent
357 pathway by a variety of volatile compounds has been reported [65,66]. Such mechanisms

358 might account for non-competitive interactions that have been observed in OSNs stimulated
359 by some binary mixtures [27].

360

361 *Peripheral interactions contribute to odorant mixture coding*

362 The present study demonstrates that a variety of interactions occur when ORs are stimulated
363 by aldehyde mixtures. Moreover, the results suggest that the type of interaction is more
364 related to the nature of the mixture itself than to the OR. These findings are of special interest
365 in terms of mixture coding prior to signal integration in the brain and their behavioral
366 consequences. Indeed, the effects observed at the OR level are strikingly reminiscent of those
367 observed in psychophysical and physiological studies in which hypo- and hyper-addition of
368 responses have been described. A recent analysis of psychophysical studies performed on the
369 quantitative properties of binary mixtures noted that partial addition was quite a systematic
370 phenomenon in binary mixtures [14]. Compromise was also observed in a substantial number
371 of cases whereas hyper-addition was not a frequent outcome [26]. In a recent study, Chaput et
372 al. [28] reported links between OR, OSN and psychophysical responses to a mixture
373 containing isoamyl acetate and whiskey lactone, suggesting that interactions at the peripheral
374 stage contribute significantly to the shaping of the perceptual characteristics of this odorant
375 mixture.

376 Perceptual characteristics of the mixtures studied here have been reported in a few
377 publications. The mixture of Cit and Oct has been shown to produce masking effects in
378 humans [36] and configural perception in rats [17,34]. More precisely, Cit perception by
379 human subjects was significantly decreased if mixed with increasing Oct concentration [36].
380 In the study performed in rats, neither Cit nor Oct was recognized for some concentration
381 mixture ratios (5:1 and 1:1 Cit-Oct ratios), suggesting a configural perception of these
382 mixtures, that is to say, the perception of a novel odor quality by these animals [17,34].
383 Although there is no simple way to correlate these qualitative properties with our
384 observations, it can be suggested that the main effect of hypo-addition, which in several cases
385 reaches compromise or subtraction, is reconcilable with masking at the behavioral level.
386 Indeed, for three of the four OR studied, high concentrations of Oct in the mixtures were
387 associated with a decrease in the OR response and even extinction for OR1A1 (Fig. 3A, E,
388 G). In these cases, the response of ORs to a high Oct ratio in the mixtures is likely shaped
389 mainly by Oct. Regarding the configural perception of the Oct + Cit mixtures in rats, the link
390 with interactions occurring at the OR level is less obvious. Nevertheless, Kay et al. [17]
391 suggested that the configural properties of a mixture would result from overlapping of

392 compounds acting as potent agonists at OR binding sites. Our results highlighted the fact that
393 Cit and Oct can activate the four studied ORs following increasing monotonous function at
394 increasing concentrations. Because configural perception of a mixture in mammals has been
395 shown to depend on the combination of specific odorants as well as the relative proportions of
396 these components [17,67-69], one can hypothesize that these two odorants may, at certain
397 concentration levels, similarly activate a large set of common ORs and induce a loss of each
398 compound identity, thus favoring a configural process.

399 Nevertheless, interactions at other levels of olfactory processing, such as the olfactory bulb
400 (OB) and higher olfactory area, must not be excluded. In the OB, lateral inhibition between
401 mitral cells would contribute in shaping odorant mixture signals [70]. However, recent
402 imaging experiments suggest that OSN input patterns onto the OB are largely analytical with
403 little mixture interaction [71-73]. In the olfactory cortex, it has been shown that anterior
404 olfactory nucleus (AON) neurons could respond in a nonlinear manner to combinations of
405 odorants within an effective mixture [74]. These findings point to the AON as a site where
406 odorant features are integrated to generate broader and more complex response patterns.
407 Regarding the Oct + Met mixture, such processing at the OB and/or central levels may
408 reshape the outgoing peripheral signal and thus account for the apparent discrepancy between
409 the results from psychophysical studies and our findings. Indeed, our results showed a
410 systematic hyper-addition for this mixture, whereas masking was described at the human
411 behavioral level [37]. It must be emphasized that mixture interactions here have been
412 investigated using only a set of four selected human ORs. Given that the OR gene family
413 comprises approximately 400 genes in humans [75], this set is likely not representative of all
414 ORs activated by these odorants. Indeed, it has long been known that a single odorant can
415 activate multiple ORs [23], the number of which can change depending on the odorant
416 concentration [20,76]. In rat, 30 μ M Oct is estimated to activate at least 6% of functional ORs
417 [20,32]. If this percentage is extrapolated to the human OR sub-genome, this would mean that
418 approximately twenty-four human ORs might respond to Oct stimulation. Furthermore, Oct-
419 responding rat ORs were found to exhibit different pharmacological profiles, that is to say,
420 some receptors can be activated to some extent by several aldehydes whereas others are
421 stimulated by only a small number of compounds [20]. Thus, Oct-responsive ORs most likely
422 do not respond to binary mixtures in the same way. It is the combination of all ORs that are
423 activated to varying extents by the mixture that will guide the qualitative and quantitative
424 features of the mixtures.

425

426 In summary, the results of the present study give evidence for multiple interactions at the OR
427 level. We observed that variations in the concentration of odorants in the mixtures produces
428 distinct interactions that likely result from different molecular mechanisms. These results are
429 in line with psychophysical studies demonstrating that perceived intensity of an odorant
430 mixture does not correspond to the sum of the intensity of its components. Taken together,
431 these findings strongly suggest that part, if not all, of the mixture perceptual features originate
432 from mechanisms that take place at the periphery of the olfactory system. Further data on the
433 molecular structure and pharmacological properties of ORs will be required to gain more
434 insight into the mechanisms involved in the peripheral encoding of odorant mixtures.

435

436

437

438 **Acknowledgments**

439 We sincerely thank Dr. G. Sanz (INRA, Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en
440 Imagerie, UR1197, Jouy-en-Josas, France) for her assistance in the implementation of
441 calcium imaging in our laboratory. We also thank Dr. H. Matsunami (Duke University
442 Medical Center, Durham, NC, USA) for the kind gift of Hana3A cells and expression vectors
443 carrying the OR1A1 gene (pCI-OR1A1), the OR2W1 gene (pCI-OR2W1) and RTP1S gene
444 (pCI-RTP1S), and Dr. K. Touhara (University of Tokyo, Tokyo, Japan) for the pMyr-FLAG-
445 Ric-8A plasmid.

446

447

448

449 **Funding**

450 This work was supported by grants from the Burgundy Regional Council and by a fellowship
451 from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the Burgundy Regional
452 Council (F. El Mountassir). The funders had no role in study design, data collection and
453 analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

454

455

456

457 **Author Contributions**

458 Conceived and designed the experiments: AMLB, FEM, TTD, LB

459 Performed the experiments: FEM, CB, AMLB

460 Analyzed the data: FEM, AMLB, TTD, CB

461 Contributed reagents/materials/analysis tools: CB, FEM, AMLB, LB, TTD

462 Wrote the paper: FEM, AMLB, TTD, LB, CB

463

464

465

466 **References**

- 467 1. Ferreira V, Lopez R, Escudero A, Cacho JF (1998) The aroma of Grenache red wine:
468 hierarchy and nature of its main odorants. *J Sci Food Agric* 77: 259-267.
- 469 2. Pichersky E, Gershenzon J (2002) The formation and function of plant volatiles: perfumes
470 for pollinator attraction and defense. *Curr Opin Plant Biol* 5: 237-243.
- 471 3. Wyatt TD (2010) Pheromones and signature mixtures: defining species-wide signals and
472 variable cues for identity in both invertebrates and vertebrates. *J Comp Physiol A -*
473 *Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 196: 685-700.
- 474 4. Livermore A, Laing DG (1998) The influence of chemical complexity on the perception of
475 multicomponent odor mixtures. *Percept Psychophys* 60: 650-661.
- 476 5. Jinks A, Laing DG (2001) The analysis of odor mixtures by humans: evidence for a
477 configurational process. *Physiol Behav* 72: 51-63.
- 478 6. Sinding C, Thomas-Danguin T, Chambault A, Beno N, Dosne T, et al. (2013) Rabbit
479 neonates and human adults perceive a blending 6-component odor mixture in a
480 comparable manner. *PloS One* 8: e53534.
- 481 7. Wiltrout C, Dogra S, Linster C (2003) Configurational and nonconfigurational interactions
482 between odorants in binary mixtures. *Behav Neurosci* 117: 236-245.
- 483 8. Coureaud G, Gibaud D, Le Berre E, Schaal B, Thomas-Danguin T (2011) Proportion of
484 odorants impacts the configural versus elemental perception of a binary blending
485 mixture in newborn rabbits. *Chem Senses* 36: 693-700.
- 486 9. Laska M, Hudson R (1993) Discriminating parts from the whole: determinants of odor
487 mixture perception in squirrel-monkeys, *saimiri-sciureus*. *J Comp Physiol A - Sens*
488 *Neural Behav Physiol* 173: 249-256.
- 489 10. Livermore A, Hutson M, Ngo V, Hadjisimos R, Derby CD (1997) Elemental and
490 configural learning and the perception of odorant mixtures by the spiny lobster
491 *Panulirus argus*. *Physiol Behav* 62: 169-174.
- 492 11. Eschbach C, Vogt K, Schmuker M, Gerber B (2011) The similarity between odors and
493 their binary mixtures in *Drosophila*. *Chem Senses* 36: 613-621.
- 494 12. Cain WS, Drexler M (1974) Scope and evaluation of odor counteraction and masking.
495 *Ann N Y Acad Sci* 237: 427-439.
- 496 13. Thomas-Danguin T, Chastrette M (2002) Odour intensity of binary mixtures of odorous
497 compounds. *C R Biol* 325: 767-772.

- 498 14. Ferreira V (2012) Revisiting psychophysical work on the quantitative and qualitative
499 odour properties of simple odour mixtures: a flavour chemistry view. Part 1: intensity
500 and detectability. A review. *Flavour Frag J* 27: 124-140.
- 501 15. Bell GA, Laing DG, Panhuber H (1987) Odor mixture suppression: evidence for a
502 peripheral mechanism in human and rat. *Brain Res* 426: 8-18.
- 503 16. Derby CD (2000) Learning from spiny lobsters about chemosensory coding of mixtures.
504 *Physiol Behav* 69: 203-209.
- 505 17. Kay LM, Lowry CA, Jacobs HA (2003) Receptor contributions to configural and
506 elemental odor mixture perception. *Behav Neurosci* 117: 1108-1114.
- 507 18. Firestein S (2001) How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413: 211-218.
- 508 19. Serizawa SU, Miyamichi K, Sakano H (2004) One neuron-one receptor rule in the mouse
509 olfactory system. *Trends Genet* 20: 648-653.
- 510 20. Araneda RC, Peterlin Z, Zhang X, Chesler A, Firestein S (2004) A pharmacological
511 profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. *J Physiol* 555:
512 743-756.
- 513 21. Saito H, Chi Q, Zhuang H, Matsunami H, Mainland JD (2009) Odor coding by a
514 mammalian receptor repertoire. *Sci Signal* 2: ra9.
- 515 22. Nara K, Saraiva LR, Ye X, Buck LB (2011) A large-scale analysis of odor coding in the
516 olfactory epithelium. *J Neurosci* 31: 9179-9191.
- 517 23. Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*
518 96: 713-723.
- 519 24. Duchamp-Viret P, Duchamp A, Chaput MA (2000) Peripheral odor coding in the rat and
520 frog: quality and intensity specification. *J Neurosci* 20: 2383-2390.
- 521 25. Kajiya K, Inaki K, Tanaka M, Haga T, Kataoka H, et al. (2001) Molecular bases of odor
522 discrimination: reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of
523 odorants. *J Neurosci* 21: 6018-6025.
- 524 26. Duchamp-Viret P, Duchamp A, Chaput MA (2003) Single olfactory sensory neurons
525 simultaneously integrate the components of an odour mixture. *Eur J Neurosci* 18:
526 2690-2696.
- 527 27. Rospars J-P, Lansky P, Chaput M, Duchamp-Viret P (2008) Competitive and
528 noncompetitive odorant interactions in the early neural coding of odorant mixtures. *J*
529 *Neurosci* 28: 2659-2666.
- 530 28. Chaput MA, El Mountassir F, Atanasova B, Thomas-Danguin T, Le Bon AM, et al.
531 (2012) Interactions of odorants with olfactory receptors and receptor neurons match

- 532 the perceptual dynamics observed for woody and fruity odorant mixtures. *Eur J*
533 *Neurosci* 35: 584-597.
- 534 29. Münch D, Schmeichel B, Silbering AF, Galizia CG (2013) Weaker ligands can dominate
535 an odor blend due to syntopic interactions. *Chem Senses* 38: 293-304.
- 536 30. Cruz G, Lowe G (2013) Neural coding of binary mixtures in a structurally related odorant
537 pair. *Sci Rep* 3: 1220.
- 538 31. Rospars JP (2013) Interactions of odorants with olfactory receptors and other
539 preprocessing mechanisms: how complex and difficult to predict? *Chem Senses* 38:
540 283-287.
- 541 32. Peterlin Z, Li YD, Sun GX, Shah R, Firestein S, et al. (2008) The importance of odorant
542 conformation to the binding and activation of a representative olfactory receptor.
543 *Chem Biol* 15: 1317-1327.
- 544 33. Araneda RC, Kini AD, Firestein S (2000) The molecular receptive range of an odorant
545 receptor. *Nat Neurosci* 3: 1248-1255.
- 546 34. Kay LM, Crk T, Thorngate J (2005) A redefinition of odor mixture quality. *Behav*
547 *Neurosci* 119: 726-733.
- 548 35. Sokolic L, Laing DG, McGregor IS (2007) Asymmetric suppression of components in
549 binary aldehyde mixtures: behavioral studies in the laboratory rat. *Chem Senses* 32:
550 191-199.
- 551 36. Burseg KMM, de Jong C (2007) Olfactoscan: advances in analytical techniques for off-
552 flavor masking in foods and beverages. *Abstr Pap Am Chem Soc* 234.
- 553 37. Burseg K, de Jong C (2009) Application of the olfactoscan method to study the ability of
554 saturated aldehydes in masking the odor of methional. *J Agric Food Chem* 57: 9086-
555 9090.
- 556 38. Sanz G, Schlegel C, Pernollet JC, Briand L (2005) Comparison of odorant specificity of
557 two human olfactory receptors from different phylogenetic classes and evidence for
558 antagonism. *Chem Senses* 30: 69-80.
- 559 39. Schmiedeberg K, Shirokova E, Weber H-P, Schilling B, Meyerhof W, et al. (2007)
560 Structural determinants of odorant recognition by the human olfactory receptors
561 OR1A1 and OR1A2. *J Struct Biol* 159: 400-412.
- 562 40. Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi QY, Matsunami H (2004) RTP family members
563 induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* 119: 679-691.
- 564 41. Patte F, Laffort P (1979) An alternative model of olfactory quantitative interaction in
565 binary mixtures. *Chem Senses Flavour* 4: 267-274.

- 566 42. Olsson MJ (1994) An interaction model for odor quality and intensity. *Percept*
567 *Psychophys* 55: 363-372.
- 568 43. Atanasova B, Thomas-Danguin T, Langlois D, Nicklaus S, Etievant P (2004) Perceptual
569 interactions between fruity and woody notes of wine. *Flavour Fragr J* 19: 476-482.
- 570 44. Laing DG, Jinks AL (2001) Psychophysical analysis of complex odor mixtures. *Chimia*
571 55: 413-420.
- 572 45. Cain WS, Schiet FT, Olsson MJ, deWijk RA (1995) Comparison of models of odor
573 interaction. *Chem Senses* 20: 625-637.
- 574 46. Berglund B, Olsson MJ (1993) Odor intensity interaction in binary-mixtures. *J Exp*
575 *Psychol Hum Percept Perform* 19: 302-314.
- 576 47. Derby CD, Girardot MN, Daniel PC (1991) Responses of olfactory receptor-cells of spiny
577 lobsters to binary-mixtures. 1. Intensity mixture interactions. *J Neurophysiol* 66: 112-
578 130.
- 579 48. Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A (2003) International union of
580 pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII.
581 Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* 55: 597-
582 606.
- 583 49. Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzell CH, et al. (2003) Identification
584 of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* 299:
585 2054-2058.
- 586 50. Oka Y, Omura M, Kataoka H, Touhara K (2004) Olfactory receptor antagonism between
587 odorants. *Embo J* 23: 120-126.
- 588 51. Jensen AA, Spalding TA (2004) Allosteric modulation of G-protein coupled receptors.
589 *Eur J Pharm Sci* 21: 407-420.
- 590 52. Gao ZG, Kim SK, Gross S, Chen AS, Blaustein JB, et al. (2003) Identification of essential
591 residues involved in the allosteric modulation of the human A3 adenosine receptor.
592 *Mol Pharmacol* 63: 1021-1031.
- 593 53. Heitman LH, Kleinau G, Brussee J, Krause G, Ijzerman AP (2012) Determination of
594 different putative allosteric binding pockets at the lutropin receptor by using diverse
595 drug-like low molecular weight ligands. *Mol Cell Endocrinol* 351: 326-336.
- 596 54. Gelis L, Wolf S, Hatt H, Neuhaus EM, Gerwert K (2012) Prediction of a ligand-binding
597 niche within a human olfactory receptor by combining site-directed mutagenesis with
598 dynamic homology modeling. *Angew Chem Int Ed* 51: 1274-1278.

- 599 55. Charlier L, Topin J, Ronin C, Kim S-K, Goddard WA, III, et al. (2012) How broadly
600 tuned olfactory receptors equally recognize their agonists. *Human OR1G1 as a test*
601 *case. Cell Mol Life Sci* 69: 4205-4213.
- 602 56. Launay G, Teletchea S, Wade F, Pajot-Augy E, Gibrat J-F, et al. (2012) Automatic
603 modeling of mammalian olfactory receptors and docking of odorants. *Protein Eng Des*
604 *Sel* 25: 377-386.
- 605 57. Stry A, Suwattanasophon C, Wolschann P, Buchbauer G (2007) Differences in (-
606)citronellal binding to various odorant receptors. *Biochem Biophys Res Comm* 361:
607 941-945.
- 608 58. Nygaard R, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Schwartz TW (2009) Ligand binding
609 and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci* 30: 249-259.
- 610 59. Terrillon S, Bouvier M (2004) Roles of G-protein-coupled receptor dimerization - From
611 ontogeny to signalling regulation. *Embo Rep* 5: 30-34.
- 612 60. Wade F, Espagne A, Persuy MA, Vidic J, Monnerie R, et al. (2011) Relationship between
613 homo-oligomerization of a mammalian olfactory receptor and its activation state
614 demonstrated by bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 286: 15252-
615 15259.
- 616 61. Wang C-IA, Lewis RJ (2013) Emerging opportunities for allosteric modulation of G-
617 protein coupled receptors. *Biochem Pharmacol* 85: 153-162.
- 618 62. Pin JP, Galvez T, Prezeau L (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of
619 family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98: 325-354.
- 620 63. Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA (2009) Allosteric communication
621 between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat*
622 *Chem Biol* 5: 688-695.
- 623 64. Szalai B, Barkai L, Turu G, Szidonya L, Varnai P, et al. (2012) Allosteric interactions
624 within the AT(1) angiotensin receptor homodimer: role of the conserved DRY motif.
625 *Biochem Pharmacol* 84: 477-485.
- 626 65. Takeuchi H, Ishida H, Hikichi S, Kurahashi T (2009) Mechanism of olfactory masking in
627 the sensory cilia. *J Gen Physiol* 133: 583-601.
- 628 66. Ukhanov K, Brunert D, Corey EA, Ache BW (2011) Phosphoinositide 3-kinase-dependent
629 antagonism in mammalian olfactory receptor neurons. *J Neurosci* 31: 273-280.
- 630 67. Linster C, Smith BH (1999) Generalization between binary odor mixtures and their
631 components in the rat. *Physiol Behav* 66: 701-707.

- 632 68. Le Berre E, Beno N, Ishii A, Chabanet C, Etievant P, et al. (2008) Just noticeable
633 differences in component concentrations modify the odor quality of a blending
634 mixture. *Chem Senses* 33: 389-395.
- 635 69. Sinding C, Thomas-Danguin T, Crepeaux G, Schaal B, Coureaud G (2011) Experience
636 influences elemental and configural perception of certain binary odour mixtures in
637 newborn rabbits. *J Exp Biol* 214: 4171-4178.
- 638 70. Giraudet P, Berthommier F, Chaput M (2002) Mitral cell temporal response patterns
639 evoked by odor mixtures in the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* 88: 829-838.
- 640 71. Grossman KJ, Mallik AK, Ross J, Kay LM, Issa NP (2008) Glomerular activation patterns
641 and the perception of odor mixtures. *Eur J Neurosci* 27: 2676-2685.
- 642 72. Lin DY, Shea SD, Katz LC (2006) Representation of natural stimuli in the rodent main
643 olfactory bulb. *Neuron* 50: 937-949.
- 644 73. Fletcher ML (2011) Analytical processing of binary mixture information by olfactory bulb
645 glomeruli. *PloS One* 6: e29360.
- 646 74. Lei H, Mooney R, Katz LC (2006) Synaptic integration of olfactory information in mouse
647 anterior olfactory nucleus. *J Neurosci* 26: 12023-12032.
- 648 75. Matsui A, Go Y, Niimura Y (2010) Degeneration of olfactory receptor gene repertoires in
649 primates: no direct link to full trichromatic vision. *Mol Biol Evol* 27: 1192-1200.
- 650 76. Fried HU, Fuss SH, Korsching SI (2002) Selective imaging of presynaptic activity in the
651 mouse olfactory bulb shows concentration and structure dependence of odor responses
652 in identified glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3222-3227.
- 653
- 654

655 **Figure legends**

656 **Figure 1: Quantitative interactions induced by binary mixtures.** The different features of
657 OR responses to binary mixtures are represented using the $[\sigma = f(\tau)]$ plot proposed by Patte
658 and Laffort [36] (see Material and Methods). Different types of interactions can be delimited
659 in this plot based on OR response intensity (R). When $\sigma > 1$ (i.e., $R_{\text{mix}} > R_A + R_B$), there is
660 hyper-addition. When $\sigma = 1$ (i.e., $R_{\text{mix}} = R_A + R_B$), there is complete addition. And when $\sigma < 1$
661 (i.e., $R_{\text{mix}} < R_A + R_B$), there is hypo-addition. Hypo-addition can be divided into three
662 subtypes: partial addition when $\max(\tau_A, \tau_B) < \sigma < 1$ (i.e., $\max(R_A, R_B) < R_{\text{mix}} < R_A + R_B$),
663 compromise when $\min(\tau_A, \tau_B) < \sigma < \max(\tau_A, \tau_B)$ (i.e., $\min(R_A, R_B) < R_{\text{mix}} < \max(R_A, R_B)$),
664 subtraction when $\sigma < \min(\tau_A, \tau_B)$ (i.e., $R_{\text{mix}} < \min(R_A, R_B)$). In this plot (where $\sigma = f(\tau_B)$),
665 odorant A is mainly active in the mixture on the left side of the graph (single A when $\tau_B = 0$)
666 and the mixture becomes single B on the right side of the graph ($\tau_B = 1$). When $\tau_B = 0.5$, the
667 mixture can be considered as iso-responsive (i.e., the mixture contains a concentration of A
668 that induces the same OR response as the concentration of B, and it is likely not a 50/50
669 concentration ratio because A and B do not have the same affinity and/or efficiency for the
670 OR). The upper diagonals correspond to higher response levels of single odorants (i.e.,
671 $\max R_A$ on the left of the upper diagonal, $\max R_B$ on the right) whereas the lower diagonals
672 correspond to the weaker response levels of single odorants (i.e., $\min R_B$ on the left of the
673 lower diagonal, $\min R_A$ on the right).

674

675 **Figure 2: Activation of OR1G1-, OR2W1-, OR52D1-, OR1A1-expressing Hana3A cells**
676 **by single odorant molecules.** A: Cell responses to Oct (●) and Cit (▼). B: Cell responses to
677 Oct (●) and Met (■). The properties of the two couples of odorants were assessed in separate
678 experiments. The results were reported as the average percentage of responding cells
679 normalized to those responding to 100 μM ATP. Error bars indicate standard error of the
680 mean (SEM, $n = 3$ independent experiments).

681

682 **Figure 3: Response of OR1G1-, OR2W1-, OR52D1-, OR1A1-expressing Hana3A cells to**
683 **binary mixtures containing octanal (Oct) and citronellal (Cit).** OR-expressing cells were
684 stimulated by increasing concentrations of single odorants and by mixtures containing all
685 possible ratios of Oct and Cit. Graphs A, C, E, G: results were reported as the average

686 percentage of responding cells normalized to those responding to 100 μ M ATP. Error bars
687 indicate standard error of the mean (SEM, n = 3 independent experiments). The graphs show
688 the effects of increasing concentrations of Oct alone (\bullet) and the effects of mixtures, that are
689 presented as follows: (\circ) increasing concentrations of Oct + 0.1 mM Cit, (∇) increasing
690 concentrations of Oct + 0.3 mM Cit, (Δ) increasing concentrations of Oct + 0.5 mM Cit, (\square)
691 increasing concentrations of Oct + 0.7 mM Cit, and (\diamond) increasing concentrations of Oct + 1
692 mM Cit. The first point of the mixture curves indicates the level of OR response to Cit alone
693 (i.e., Oct concentration = 0). Graphs B, D, F, H: intensity ratings for Oct + Cit mixtures using
694 the $\sigma = f(\tau)$ representation (see Fig. 1). Symbols represent the mean σ for the mixture at the
695 considered response proportion (τ) of Oct.

696

697 **Figure 4: Responses of OR1G1-, OR2W1-, OR52D1-, OR1A1-expressing Hana3A cells**
698 **to binary mixtures containing octanal (Oct) and methional (Met).** OR-expressing cells
699 were stimulated by increasing concentrations of single odorants and by mixtures containing
700 all possible ratios of Oct and Met. Graphs A, C, E, G: results were reported as the average
701 percentage of responding cells normalized to those responding to 100 μ M ATP. Error bars
702 indicate standard error of the mean (SEM, n = 3 independent experiments). The graphs show
703 the effects of increasing concentrations of Oct alone (\bullet) and the effects of mixtures, that are
704 presented as follows: (\circ) increasing concentrations of Oct + 0.001 mM Met, (∇) increasing
705 concentrations of Oct + 0.01 mM Met, (Δ) increasing concentrations of Oct + 0.03 mM Met,
706 (\square) increasing concentrations of Oct + 0.1 mM Met, (\diamond) increasing concentrations of Oct + 0.3
707 mM Met, and (\times) increasing concentrations of Oct + 0.5 mM Met. The first point of the
708 mixture curves indicates the level of OR response to Met alone (i.e., Oct concentration = 0).
709 Graphs B, D, F, H: intensity ratings for Oct + Met mixtures using the $\sigma = f(\tau)$ representation
710 (see Fig. 1). Symbols represent the mean σ for the mixture at the considered response
711 proportion (τ) of Oct.

712

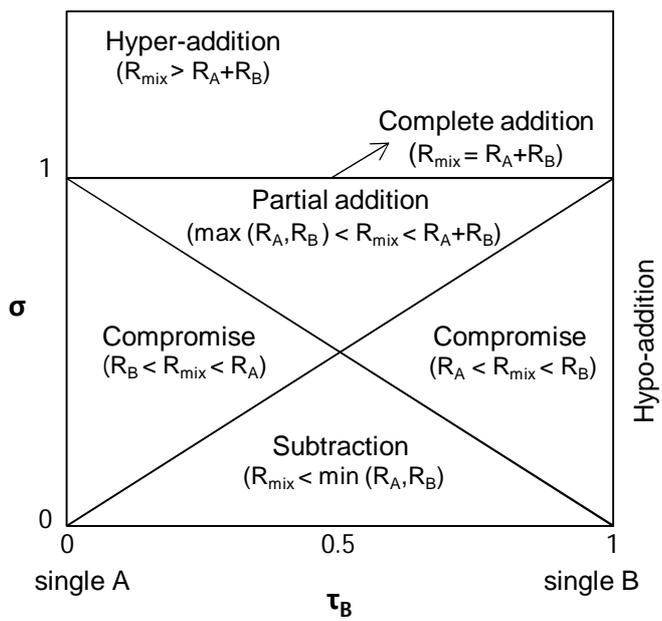


Figure 1

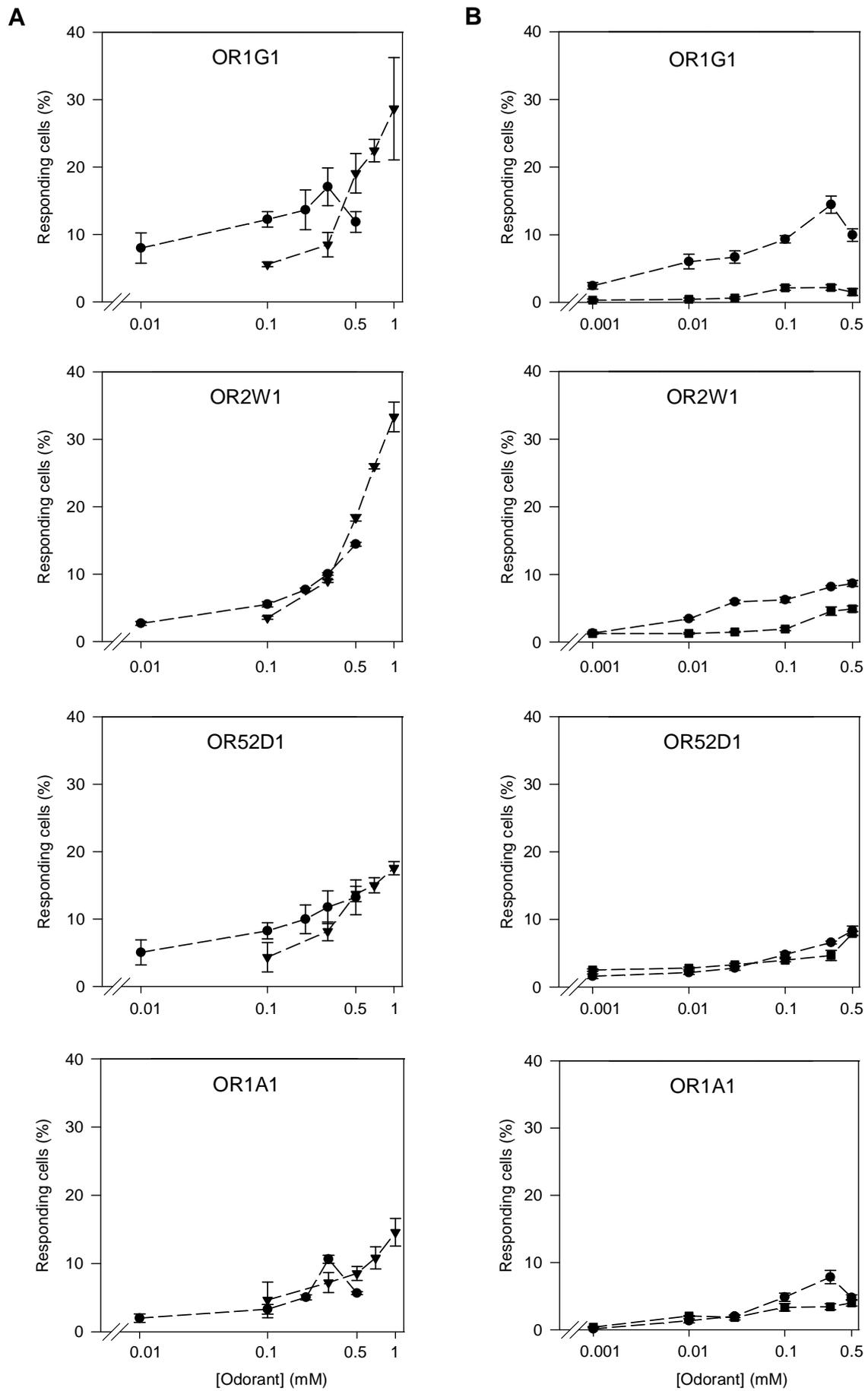


Figure 2

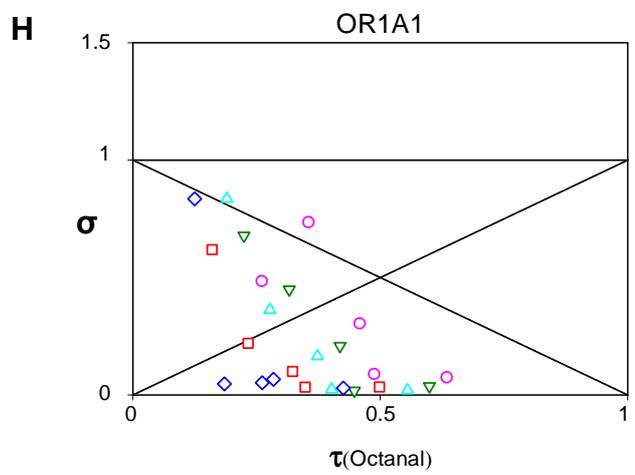
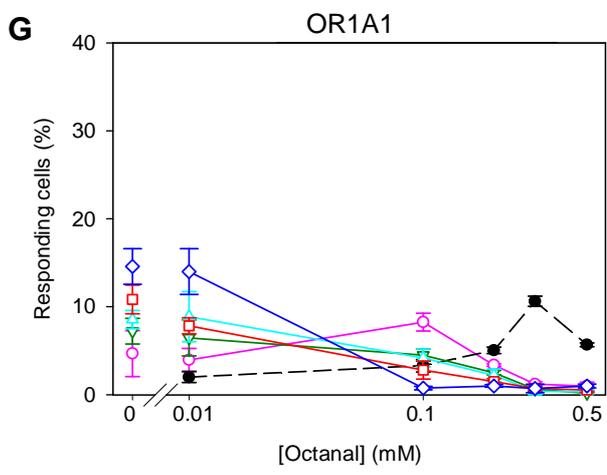
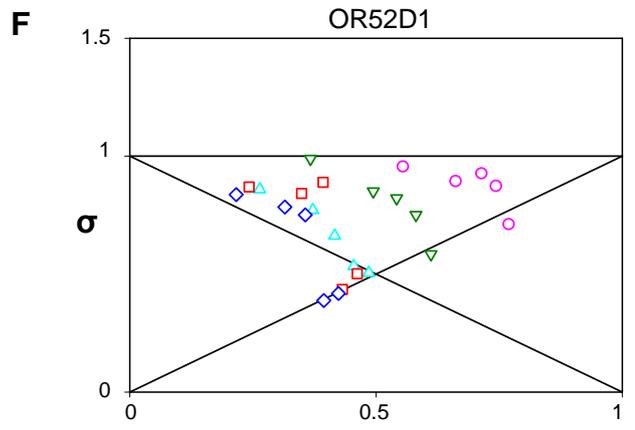
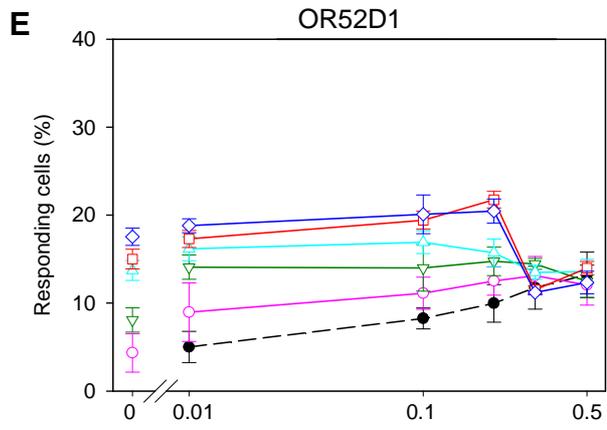
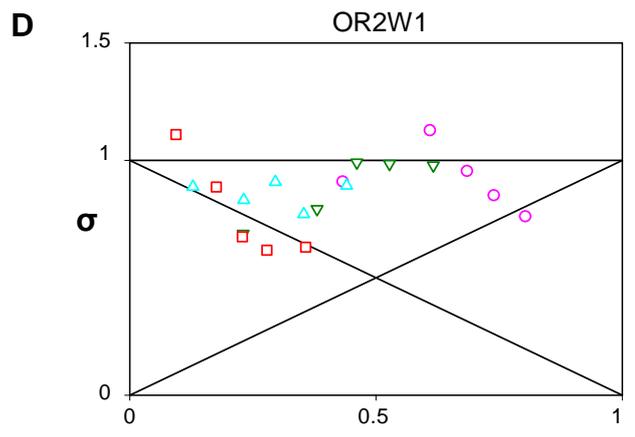
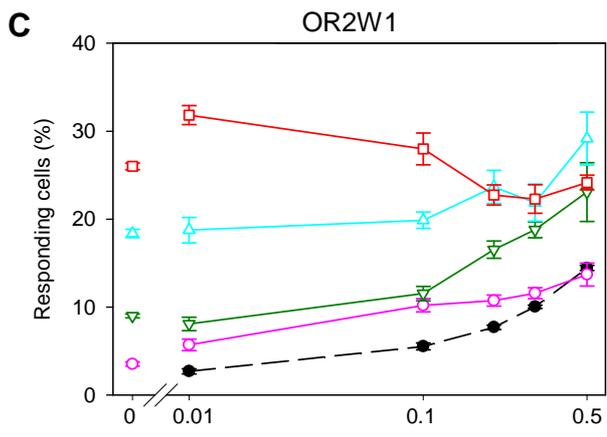
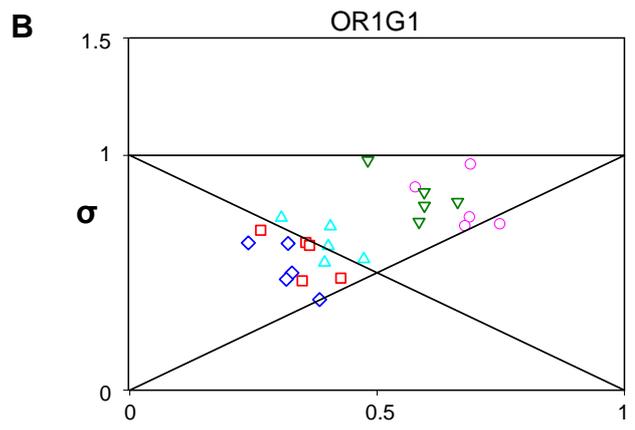
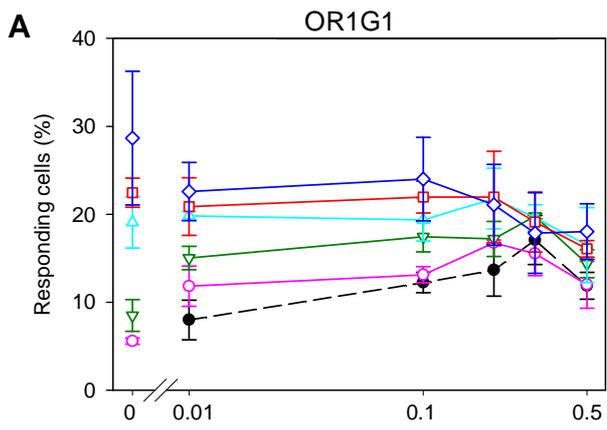


Figure 3

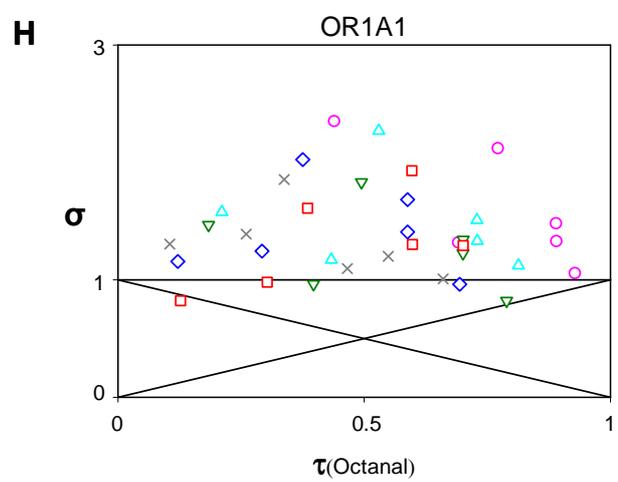
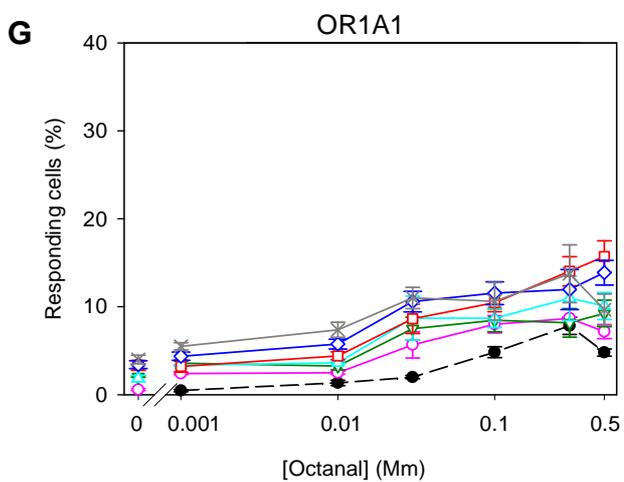
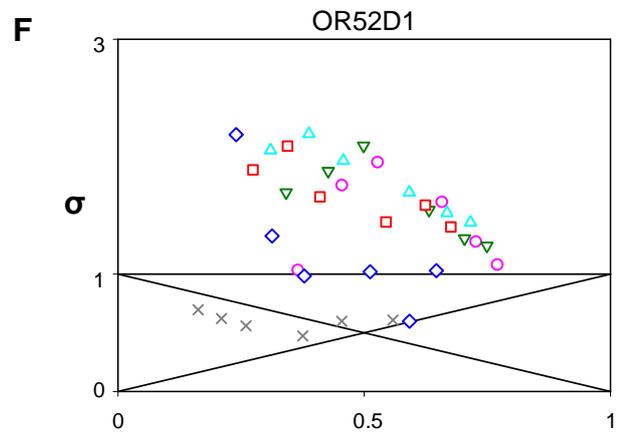
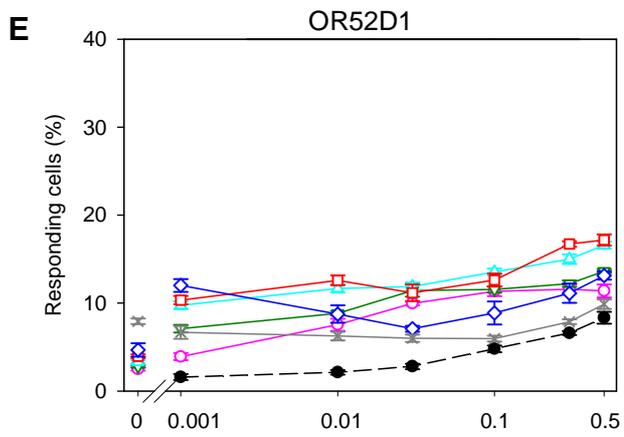
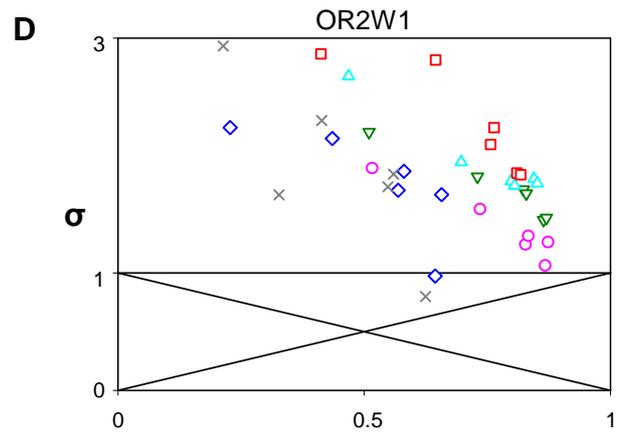
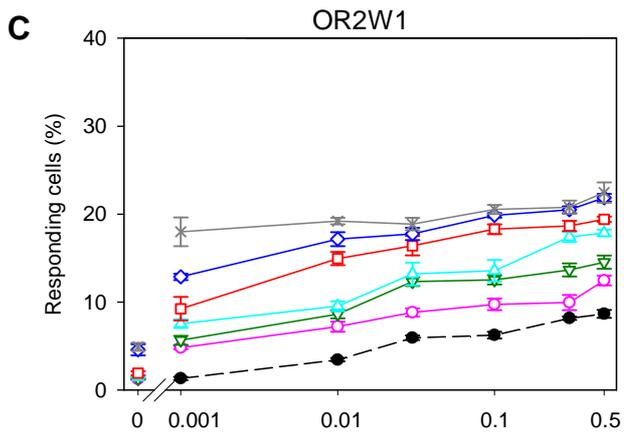
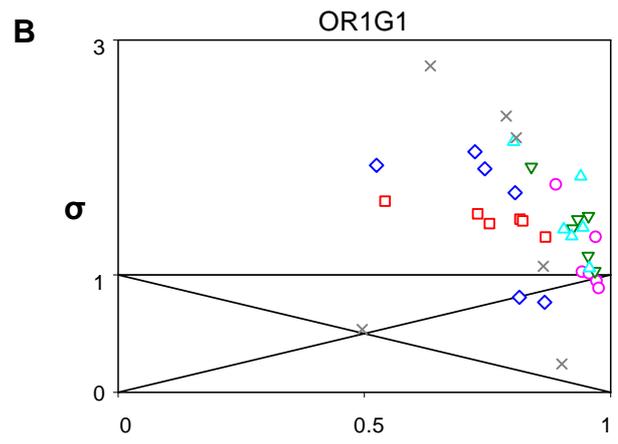
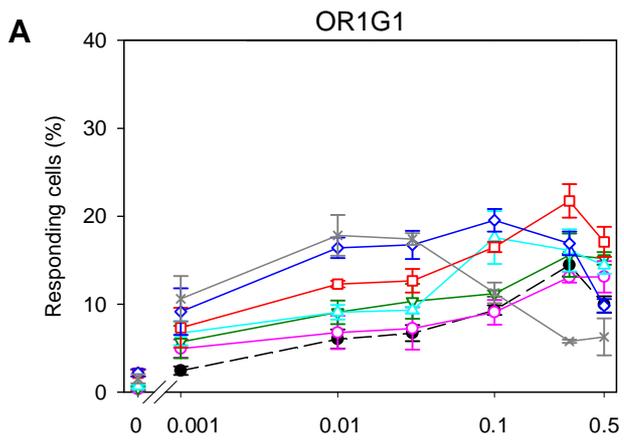


Figure 4

Annexe 2 : Test européen de la capacité olfactive (ETOC)



Neurosciences et Systèmes Sensoriels

CNRS, UCB LYON I 50, avenue Tony Garnier 69366 LYON cedex 07 - tel : 04 37 28 74 97

Code Sujet : PS

Age :

Niveau d'étude :

Date du test :

N° du test :

Expérimentateur :

Sexe : M F

Heure du test :

Date préparation :

Fumeur : jamais actuel ancien

Nb cigarettes/j : Durée (an) : Arrêt (an) :

Problèmes d'odorat : Oui Non

Nature : Durée (an) :

Affections liées à l'odorat :

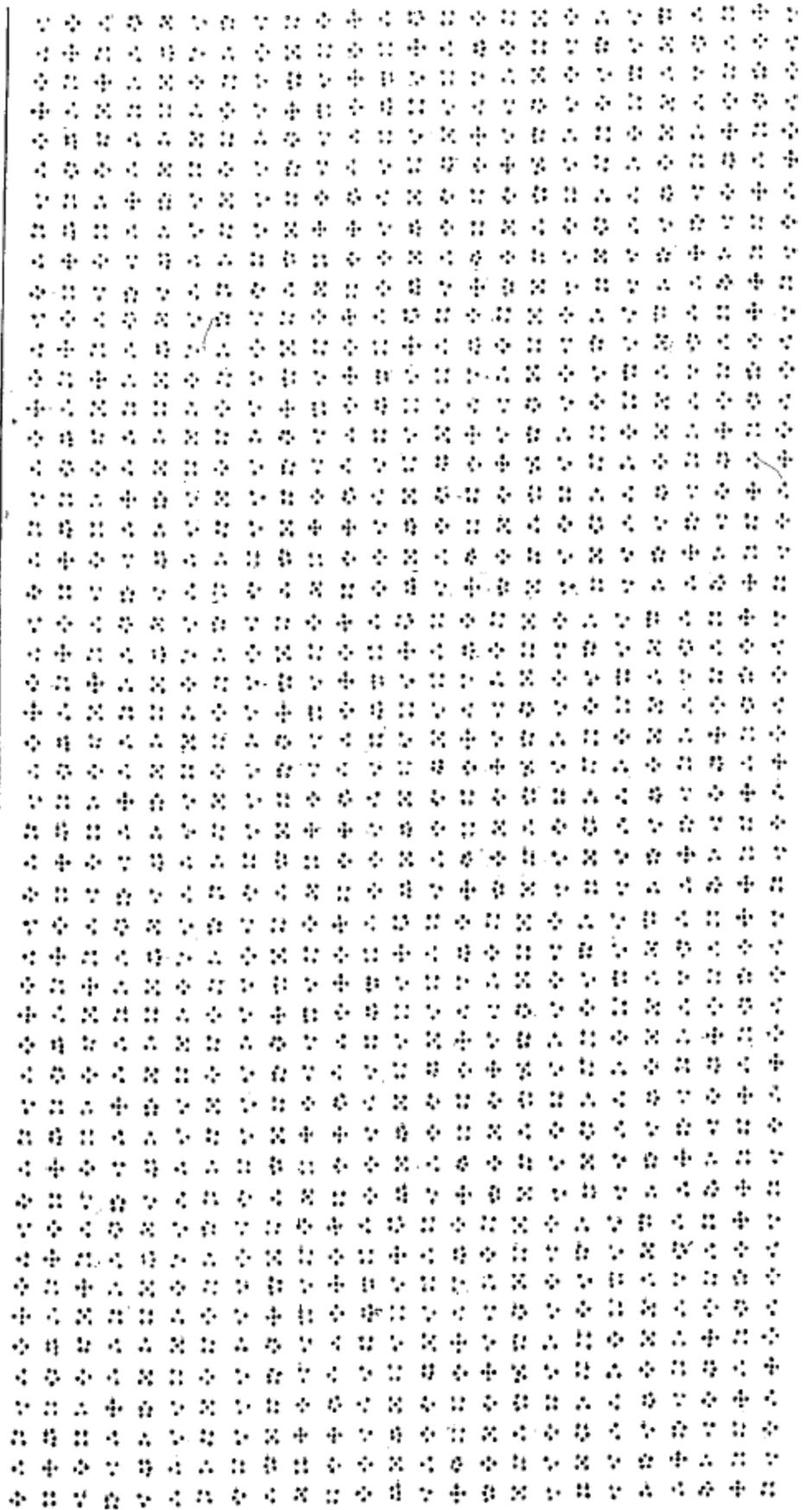
Lieu :

Version ETOC

N°	Localisation				Identification				Remarques
1	A	B	C	D	Noix de coco	Chocolat	Vanille	Pain	
2	A	B	C	D	Lavande	Clou de girofle	Ciboulette	Champignon	
3	A	B	C	D	Mandarine	Abricot	Pamplemousse	Pomme	
4	A	B	C	D	Violette	Fraise	Eucalyptus	Tomate	
5	A	B	C	D	Cannelle	Noisette	Beurre	Café	
6	A	B	C	D	Peinture	Fioul	Urine	Tabac	
7	A	B	C	D	Goudron	Lilas	Pin	Concombre	
8	A	B	C	D	Chou	Ail	Poireau	Céleri	
9	A	B	C	D	Herbe coupée	Melon	Cassis	Jasmin	
10	A	B	C	D	Amande	Anis	Rhum	Cumin	
11	A	B	C	D	Orange	Banane	Mûre	Poire	
12	A	B	C	D	Oignon	Poivron	Fromage	Poisson	
13	A	B	C	D	Vinaigre	Carotte	Rose	Cerise	
14	A	B	C	D	Thym	Réglisse	Persil	Poivre	
15	A	B	C	D	Framboise	Ananas	Pêche	Citron	
16	A	B	C	D	Noix de muscade	Olive	Basilic	Menthe	

Annexe 3 : Test Bourdon

NOM :
PRENOM :
DATE DE NAISSANCE :
DATE DU TEST :



Publications et communications issues de ce travail de thèse

Publications

M.A. Chaput, **F. El Mountassir**, B. Atanasova, T. Thomas-Danguin, A.M. Le Bon, A. Perrut, B. Ferry, P. Duchamp-Viret 2012. Interactions of odorants with olfactory receptor and receptor neurons match the perceptual dynamics observed for woody and fruity odorant mixtures. *European Journal of Neurosciences* 35 :584-597.

F. El Mountassir, C. Belloir, L. Briand, T. Thomas-Danguin, AM. Le Bon (2013) Encoding odorant mixtures by human olfactory receptors. *European Journal of Neuroscience*. (Soumis)

Communications orales

El Mountassir F., Belloir C., Beno. N., Briand.L., Thomas-Danguin T., Le Bon A.M. De la molécule à l'odeur Journée des doctorants, Dijon, 20 Décembre 2012.

El Mountassir F., Belloir C., Beno. N., Briand.L., Thomas-Danguin T., Le Bon A.M. Rôle des interactions périphériques dans la construction de l'image sensorielle olfactive. XIXème Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, 13-14 Juin 2013.

Posters

El Mountassir F., Belloir C., Miller M.L., Briand L., Le Bon A.M. (2010). Interactions between octanal and citronellal at the receptor level. The XX Congress of the European Chemoreception Research Organisation (ECRO). Avignon, (Fr). September 15th-19th.

El Mountassir F., Belloir C., Thomas-Danguin T., Le Bon A.M. (2011). Mécanismes impliqués dans la détection périphérique d'un mélange d'odorants. XVIIème Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, (Fr). 16-17 Juin 2011.

El Mountassir F., Belloir C., Thomas-Danguin T., Le Bon A.M. (2011). Evidence for multiple interactions at the olfactory receptor level. The XXI Congress of the European Chemoreception Research Organisation (ECRO). Manchester, (GB), September 7th-10th,

El Mountassir F., Belloir C., Béno N., Briand L., Thomas-Danguin T., Le Bon A.M. (2012). Perceptual responses to odorants mixtures originate mainly from peripheral processing. XVI international Symposium on olfaction and taste (ISOT). Stockholm, (Sweden), June 23-27th.

El Mountassir F., Belloir C., L. Briand Thomas-Danguin T., Le Bon A.M. (2013). Interactions at the olfactory receptor level contribute to the coding of odorant mixtures. XXXV Association for Chemoreception Sciences (AChemS). Californie, (USA), April 17-20th.

Rôle des interactions périphériques dans la construction de l'image sensorielle olfactive

Résumé

Les odeurs résultent la plupart du temps de la perception de mélanges de molécules odorantes. De nombreuses études ont montré que les caractéristiques perceptives des mélanges d'odorants sont souvent différentes de celles de leurs constituants. Ainsi l'intensité odorante d'un mélange peut être supérieure (synergie ou hyper-addition) ou inférieure (hypo-addition) à la simple somme arithmétique des intensités des constituants du mélange. Les mélanges d'odorants peuvent également donner lieu à de nouvelles qualités d'odeurs (perception synthétique) ou laisser apparaître celles des constituants (perception analytique). Cependant, les mécanismes biologiques impliqués dans la perception des mélanges restent méconnus. Quelques études montrent que des interactions à l'entrée du système olfactif pourraient jouer un rôle important dans le traitement de l'information olfactive. En effet, des interactions compétitives et non compétitives ont été observées au niveau des récepteurs olfactifs (RO) et des neurones sensoriels olfactifs (NSO). Dans cette thèse, nous avons étudié en parallèle les réponses des RO et des NSO ainsi que les réponses comportementales à trois mélanges binaires: Octanal (Oct) + Citronnellal (Cit), Oct + Méthional (Méth) et acétate d'isoamyle (ISO) + whisky lactone (WL). Trois approches ont été mises en œuvre: i) des études *in vitro* des RO par imagerie calcique sur des cellules HEK293; ii) des mesures *ex-vivo* d'électro-olfactogrammes au niveau des NSO de rat ; iii) des études psychophysiques chez l'Homme. Les résultats ont montré de fortes similitudes entre les réponses des RO/NSO et les réponses perceptives chez l'Homme pour les mélanges Oct + Méth et WL + ISO. Les liens sont moins importants pour le mélange Oct + Cit pour lequel les RO étudiés génèrent des réponses différentes de celles observées aux niveaux plus intégrés. Globalement, ces résultats soutiennent l'hypothèse que les interactions qui se produisent au niveau périphérique contribuent de manière significative au codage olfactif des mélanges odorants.

Abstract

Odours result from the perception of odorant mixtures. Several studies reported that perceptual characteristics of these mixtures are often different from those of their individual components. It has been shown that odour intensity for mixtures can be higher (synergy/hyper-addition) or lower (hypo-addition) than the simple arithmetic sum of each component's intensity. Besides, mixtures can also give rise to novel odour qualities (configural perception) or conversely are perceived as the juxtaposition of individual components' odour quality (elemental perception). However, the biological mechanisms that govern odour mixture perception remain unclear, even if there is increasing evidence that peripheral phenomena could play an important role in mixture processing. Indeed, competitive and non-competitive interactions have been observed at the olfactory receptor (OR) and olfactory sensory neuron (OSN) levels. In this PhD work, we investigated in parallel the responses of OR, OSN and human behavioural responses for three binary mixtures of odorants: Octanal (Oct) + Citronellal (Cit), Oct + Methional (Meth) and isoamyl acetate (ISO) + whiskey lactone (WL). Three types of experiments were performed: (i) *in vitro* OR calcium imaging of HEK293 cells; (ii) *ex vivo* electro-olfactogram measurement on rat OSN; (iii) psychophysical measurements in human. Our results showed clear similarities between the responses of OR/OSN and perceptual responses in human for the two mixtures Oct + Meth and ISO + WL, whereas for the Oct + Cit mixture, OR responses are hardly reconcilable with more integrated responses. Taken together, these findings support the hypothesis that interactions occurring at the peripheral level of the olfactory system contribute significantly to the olfactory coding of odour mixture.