UNIVERSITE d'EVRY VAL D'ESSONNE (UEVE)

Ecole doctorale des Génomes Aux Organismes (GAO)

Neurobiologie de l'Olfaction (NBO) - UR 1197
INSTITUT NATIONAL de RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)
Centre de Recherche de Jouy-en-Josas

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université d'Evry Val d'Essonne
Spécialité : Sciences de la vie
Option : Neurosciences

Par Mikaël LE BOURHIS

Soutenue le 12 février 2015

Mise en évidence et impact de la modulation des jonctions GAP des cellules gliales dans la muqueuse olfactive par l'Endothéline.

Directeur de thèse : M Nicolas MEUNIER

Co-directeur de thèse : M Patrice CONGAR

Composition du jury:
M David PASTRE – Président du Jury
M Xavier GROSMAITRE - Rapporteur
M Laurent VENANCE - Rapporteur
M Alexander FLEISCHMANN - Examinateur
M Hirac GURDEN - Examinateur

Remerciements

Comme une envie de faire des remerciements singuliers mais pour autant sincère. Cette thèse de trois ans (et un peu plus) fut un beau périple, ce qui explique certainement le champ lexical marin qui va suivre…

Avant tout, je remercie Edith Pajot, commandant de bords du navire, qui a su diriger son unité dans les eaux calmes ou les hautes vagues, qui m'a permit de vivre cette aventure, et que cette thèse se déroule dans le meilleur contexte possible.

Ensuite, merci aux membres de mon jury, capitaines renommés de leurs domaines, d'avoir accepté d'évaluer et de discuter de mes travaux : David Pastre, Laurent Venance, Alexander Fleischmann, Hirac Gurden, et Xavier Grosmaitre. Une mention particulière à ce dernier, Xavier, merci de m'avoir accueilli pour cette collaboration enrichissante.

Je remercie chaleureusement tous les compagnons d'équipage et membres de l'INRA avec qui j'ai pu interagir durant ces 3 ans, qui ont su faire de ce contexte de travail dynamique et agréable. Merci à vous tous, Iman, Stéphanie, Aurélie, Birte, Karine, Christine, Marie-Christine, Marie-Annick, Régine, Marie José, Guenhaël, Isabelle, Gaëlle, Olivier, Sacha, Didier, Roland...

Durant mon parcours, j'ai eu l'occasion de croiser le chemin de jeunes moussaillons prometteurs : Julie, Virginie, Bertrand, Charles… Nos échanges humano-scientifiques furent très enrichissants et je vous souhaite de vivre à votre tour une belle aventure.

Une mention particulière à l'intention de Vincent, Adrien, et encore Adrien !! Nous avons partagé quelques tonneaux de sciences, mais pas que… J'espère que la suite nous en réserve encore de nombreux.

Un grand grand merci à Denise !! Réelle cuisinière aux recettes miracles et parfaitement rédigées, ton aide fut inestimable pour mijoter toutes ces

cellules. Et merci encore pour ta flexibilité face aux changements de dernière minute (car il y en a eu !).

Je continuerai avec ceux qui ont toujours été là, même s'ils ne comprenaient pas toujours mon activité : toutes mes cheerleaders et amis pirates, merci pour votre soutien inébranlable !

Mes parents évidemment à qui je dois beaucoup, et qui m'ont permis de pourvoir suivre cette formation. Je vous en suis très reconnaissant. Puis c'est aussi grâce à vous si j'ai mes frères, mes coachs au quotidien. Vous trois, vous avez été un peu comme mes étoiles du berger, pour me guider quand la navigation fut difficile. Merci pour votre réconfort et vos conseils.

Evidemment un merci immesurable à cette perle rare qui m'a accompagné tout au long de cette thèse. Comme annoncée, ce fut un voyage à la fois long et rapide, avec ses trésors et ses difficultés, je n'ai pas menti. Tu as suivi et partagé cette thèse avec moi, et ça me plait de savoir que tu y as mis un peu de tes qualités graphiques dedans. La thèse s'arrête ici mais notre aventure continue vers d'autres horizons…

Et enfin, ceux qui m'ont partagé leur connaissances, ceux qui m'ont fait confiance dès le début de ce trajet, ceux qui m'ont évité de chavirer et ont su me guider quand je traversais des eaux troubles, Nicolas, Patrice, un grand merci à vous. Votre complémentarité fut une réelle aubaine. Et je suis fier de ce que nous avons accompli ensemble.

Résumé

Le système nerveux central repose sur deux réseaux cellulaires partenaires : le réseau neuronal et le réseau de cellules gliales. Longtemps considérées comme simple support structural du système nerveux, il est désormais démontré que les cellules gliales sont des acteurs à part entière dans les processus de communication neuronaux.

Parallèlement, alors que les neurones olfactifs ont été largement étudiés, le rôle des cellules gliales de la muqueuse olfactive restent peu connu. En effet, si il est désormais bien établi que les cellules de soutien contribuent à maintenir la structure et l'équilibre ionique de la muqueuse et que les cellules engainantes assurent la protection et le guidage des axones vers le bulbe olfactif, une implication de ces cellules dans le traitement de l'information sensorielle reste à démontrer.

Au cours de ma thèse, en me basant sur des approches d'imagerie calcique et d'électrophysiologie, j'ai pu montrer que les cellules gliales de la muqueuse olfactive fonctionnent en réseaux reliés par jonctions GAP. Parmi les potentiels modulateurs locaux, j'ai caractérisé les réponses de l'endothéline dans la muqueuse olfactive et montré qu'elle entrainé des effets similaires à des applications de carbenoxolone (agent pharmacologique et découplant les jonctions GAP). De plus en utilisant des approches comportementales et électrophysiologique, j'ai pu montrer que la modulation de l'état d'ouverture de ces jonctions GAP module l'activité neuronale.

Mes travaux s'inscrivent donc dans la démonstration de l'implication et de l'importance des cellules gliales (SCs et OECs) dans le fonctionnement d'un système nerveux périphérique comme cela est déjà désormais bien admis dans le système nerveux central.

Mots clés : Muqueuse Olfactive, Cellules de Soutien, Cellule Engainantes, Jonctions GAP, Endothéline, Rongeurs

Abstract

The central nervous system is based on two cellular partners' networks: the neural network and the glial cell network. Long regarded as a simple structural support of the nervous system, it is now demonstrated that glial cells are integral players in neuronal communication process.

Meanwhile, as olfactory neurons have been extensively studied, the role of glial cells of the olfactory mucosa remains unknown. Indeed, if it is now well established that the supporting cells contribute to maintaining the structure and the ionic balance of the mucosa and the ensheathing cells provide protection and guidance of axons to the olfactory bulb, the involvement of these cells in the processing of sensory information remains to be demonstrated.

In my thesis, based on calcium imaging approaches and electrophysiology, I have been able to show that the glial cells of the olfactory mucosa work in networks connected by GAP junctions. Potential local modulators, I characterized the responses of endothelin in the olfactory mucosa and showed that it led to similar effects of carbenoxolone applications (pharmacological agent and decoupling the GAP junctions). In addition, using behavioral and electrophysiological approaches, I was able to show that the modulation of the opening state of the GAP junctions modulates neuronal activity.

My works are therefore part of the demonstration of the involvement and the importance of glial cells (OECs and SCs) in the process of the peripheral nervous system as is already now well accepted in the central nervous system.

Keywords: Olfactory Mucosa, Sustentacular Cells, Ensheathing Cells, GAP junctions, Endothelin, Rodents

AI …… Acetate d'Isoamyle

AMPc …… Adénosine Monophosphate cyclique

ATP …… Adénosine Triphosphate

BO …… Bulbe Olfactif

CBX …… Carbenoxolone

CP …… Culture Primaire

EO …… Epithélium Olfactif

ET-1 …… Endothéline 1

ET_A, ET_B …… Récepteurs à l'Endothéline A ou B

MO …… Muqueuse Olfactive

OECs …… Cellules Engainantes (Olfactory Ensheathing Cells)

OSNs …… Neurones Olfactifs (Olfactory Sensory Neurons)

SNC …… Système Nerveux Central

SCs …… Cellules de Soutien (Sustentacullar Cells)

S6C …… Saraphotoxine

18aGA …… 18 alpha-Glycyrrhetinic Acid

Sommaire

I. Introduction ..... - 4 -

A. Physiologie de l'olfaction ..... - 4 -

1. Anatomie du système olfactif ..... - 4 -

2. Organisation du système olfactif périphérique ..... - 7 -

a. L'organe olfactif principal ..... - 7 -

b. L'organe voméronasal ..... - 7 -

c. Autres organes du système olfactif ..... - 7 -

3. Organisation de la muqueuse olfactive ..... - 8 -

a. Neurones olfactifs ..... - 12 -

b. Cellules basales ..... - 14 -

c. Cellules de soutien ..... - 15 -

d. Cellules engainantes ..... - 21 -

4. Transduction du signal sensoriel ..... - 27 -

a. Nature et acheminement des stimuli olfactifs ..... - 27 -

b. Voie de transduction ..... - 28 -

5. De la périphérie au système nerveux central ..... - 30 -

a. Organisation du bulbe olfactif ..... - 30 -

b. Transmission de l'information olfactive à travers le bulbe olfactif - 31 -

B. L'endothéline-1 ..... - 33 -

1. Découverte et voie de synthèse ..... - 33 -

2. Fonctions de l'endothéline-1 ..... - 35 -

a. Un peptide pléiotrope ..... - 35 -

b. Modulation de la dynamique cellulaire ..... - 35 -

c. Action sur les jonctions communicantes ..... - 37 -

d. Action sur la communication nerveuse centrale ..... - 37 -

e. Modulation de la communication dans le système nerveux périphérique ..... - 38 -
3. Les récepteurs ETA et ETB aux endothélines ..... - 39 -
a. Les deux types et leur expression ..... - 39 -
b. Voie de transduction ..... - 39 -
c. Spécificité des récepteurs vis-à-vis de l'action des endothélines sur les astrocytes ..... - 40 -
4. Régulation de la voie de l'endothéline 1 ..... - 46 -
C. Les jonctions communicantes ..... - 46 -
1. Structure des jonctions communicantes ..... - 46 -
a. De la communication intercellulaire à la jonction GAP ..... - 46 -
b. De la jonction GAP aux connexines ..... - 47 -
c. Connexines : sous-unités protéiques ..... - 47 -
2. Propriétés physiologiques des jonctions communicantes ..... - 49 -
a. Couplage électrique ..... - 49 -
b. Couplage métabolique ..... - 50 -
c. Perméabilité sélective des jonctions GAP ..... - 50 -
d. Fonctions physiologiques ..... - 51 -
D. Données préliminaires ..... - 52 -
1. Présence du système endothéline in vivo ..... - 52 -
2. Mise en évidence d'un rôle potentiel d'agent découplant de l'endothéline en culture primaire ..... - 55 -
II. Matériels et Méthodes ..... - 58 -
A. Animaux ..... - 58 -
B. Cultures primaires MO ..... - 58 -
C. Enregistrements de patch-clamp sur CP ..... - 59 -
D. Immunocytochimie ..... - 61 -

E. Évaluation de la mort cellulaire par la mesure de la libération de lactate déshydrogénase ..... - 62 -
F. Préparations de tranches de MO et de BO ..... - 63 -
G. Imagerie calcique sur tranches de MO et BO ..... - 63 -
H. Explants de MO ..... - 65 -
I. Imagerie de calcium et stimulations électriques sur explant ..... - 65 -
J. Electro-olfactogrammes (EOG) ..... - 66 -
K. Comportement ..... - 68 -
III. Résultats ..... - 70 -
A. ET-1 et CBX découplent les jonctions GAP in vitro ..... - 70 -
B. Possible implication des jonctions GAP dans les mécanismes anti-apoptotique in vitro ..... - 76 -
C. ET-1 induit une activation calcique des cellules gliales de la MO ..... - 79 -
D. Confirmation ex vivo des effets découplants de l'ET-1 et CBX ..... - 83 -
E. ET-1 et de la CBX ont des effets modérés sur l'EOG ..... - 90 -
F. ET-1 et CBX affectent les performances olfactives ..... - 95 -
G. Enregistrement des nerfs olfactifs ..... - 101 -
H. Action de l'ET-1 sur les cellules gliales du BO ..... - 103 -
IV. Discussion et perspectives: ..... - 106 -
A. Approches en culture primaire ..... - 106 -
1. L'ET-1 a-t-elle une action découplante des jonctions GAP au sein de la MO ? - 106 -
2. L'action anti-apoptotique de l'ET-1 est-elle médiée par le découplage des jonctions GAP ? ..... - 108 -
B. Validation ex vivo des résultats obtenus sur culture primaire ... - 110 -

1. Activation des cellules de MO par l'ET-1 ex vivo ..... - 110 -

2. Pharmacologie des récepteurs à l'Endothéline impliqués dans les vagues calciques des cellules non neuronales de la MO ..... - 112 -

3. Découplage des jonctions GAP par l'endothéline ex vivo .... - 114 -

C. Impact de l'endothéline sur la détection des odorants ..... - 117 -

1. Evaluation au niveau du potentiel récepteur par Electro Olfactogramme. ..... - 117 -

2. Impact sur l'orientation olfactive de ratons du découplage des jonctions GAP ..... - 119 -

D. Perspectives expérimentales ..... - 121 -

V. Conclusion ..... - 124 -

VI. References ..... - 126 -

VII. Article ..... - 141 -

"Si nous prenons la nature pour guide, nous ne nous égarerons jamais."
Cicéron

L'organisation du système nerveux central est des plus complexes. Les réseaux neuronaux interconnectés permettent l'analyse, l'interprétation et la réaction d'un individu face à son environnement. Le bon fonctionnement de ces réseaux est donc primordial pour sa survie et son adaptation.

Aux côtés des neurones, et beaucoup moins étudiées que ces derniers jusqu'à assez récemment, les cellules gliales, et tout particulièrement les astrocytes, ont aussi un rôle prépondérant dans le fonctionnement cérébral. De nombreuses données de la littérature, depuis les années 90, ont mis en évidence diverses interactions fonctionnelles entre les neurones et les astrocytes et permis d'identifier leurs rôles au sein du système nerveux, bien au-delà du rôle de "glue nerveuse" initialement proposé par Virshow dans les années 1850. Les astrocytes assurent des fonctions variées (Ransom *et al.*, 2003). Ils participent au maintien de l'osmolarité et de l'homéostasie ionique (Walz, 2002; Simard & Nedergaard, 2004). Ils assurent un support trophique (Muller *et al.*, 1995) et participent également à la formation de la barrière hématoencéphalique (Janzer & Raff, 1987). Les astrocytes modulent activement la neurotransmission (Auld *et al.*, 2003), en particulier par la recapture des neurotransmetteurs (Araque *et al.*, 1999). Il est également bien connu que les astrocytes sont interconnectés par des jonctions GAP et forment un vaste réseau (Nagy *et al.*, 2004). Le niveau d'expression et la perméabilité des jonctions GAP sont modulables et différents agents interviennent pour changer les propriétés du syncytium astrocytaire (Giaume & McCarthy, 1996).

Grâce à ces réseaux neuronaux et astrocytaires en étroite relation, le système nerveux central traite un très grand nombre d'informations. Ces informations lui proviennent de sources endogènes (métaboliques, température, pression artérielle…) et également exogènes recueillies par les différentes modalités sensorielles. Parmi elles, le système olfactif assure la détection et l'analyse des molécules odorantes présentes dans

l'environnement. Les odeurs, mélanges complexes d'odorants, délivrent de nombreuses informations sur le milieu dans lequel l'animal évolue. Chez de nombreux mammifères, dont les rongeurs, l'olfaction est un système sensoriel primordial, hautement impliqué dans la plupart des comportements. Les interactions sociales, la reproduction et le comportement alimentaire en sont les exemples les plus souvent cités. Le système olfactif se compose d'un système périphérique assurant la chémoréception des molécules, et de structures centrales permettant l'analyse, l'intégration et le traitement de l'information. Au niveau périphérique, la muqueuse olfactive (MO) est en contact direct avec le milieu extérieur. Ce tissu nerveux, tout comme le système nerveux central, se compose, entre autres, de cellules neuronales et de cellules de types gliales : les cellules sustentaculaires (SCs) et les cellules engainantes (OECs). Alors que les neurones olfactifs reconnaissent et discriminent les molécules odorantes, les cellules de types gliales ont tout d'abord des fonctions de soutien et de structuration du tissu. De même que les astrocytes dans le cerveau, les SCs et les OECs jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, en assurant l'équilibre ionique et en sécrétant certains facteurs trophiques (Kanekar *et al.*, 2009; Jia & Hegg, 2010; Jia *et al.*, 2011) ; (Chuah & West, 2002). Des travaux récents ont montré que ces deux types de cellules gliales de la MO sont connectées par des jonctions GAP (Barnett *et al.*, 2001; Vogalis *et al.*, 2005a; Rela *et al.*, 2010).

Ainsi, l'ensemble des données récentes concernant les astrocytes souligne la complexité, la diversité et l'importance des interactions entre astrocytes et neurones pour la physiologie cérébrale. Qu'en est-il alors pour la physiologie olfactive : les cellules sustentaculaires et les cellules engainantes peuvent-elles moduler l'activité des neurones olfactifs et participer à la genèse du signal olfactif périphérique ? Et quel est l'implication des jonctions communicantes entre ces cellules ?

Pour tenter de répondre à ces questions, j'ai fondé mon travail sur certains résultats obtenus précédemment par le laboratoire, dans le cadre d'études réalisées sur les effets de peptides vasoactifs, et en particulier

l'endothéline, sur les cellules de la muqueuse olfactive. Ces travaux montraient que le système endothéline (enzyme de synthèse, récepteurs) était largement exprimé dans les cellules neuronales et non-neuronales de la muqueuse olfactive en culture, dans lesquelles l'endothéline pouvait générer de fortes réponses calciques (Gouadon *et al.*, 2010). Or, il est par ailleurs connu, dans le système nerveux central, que l'endothéline est un inhibiteur très efficace de la communication par les jonctions GAP entre les astrocytes (Blomstrand *et al.*, 2004). Des expériences préliminaires de stimulations électriques sur culture primaire de muqueuse olfactive suggéraient que ce peptide pouvait avoir un effet comparable sur les communications inter-cellulaires dans la muqueuse olfactive.

Je me suis donc posé deux questions principales, qui ont guidé mon travail de thèse :

L'endothéline a-t-elle un rôle de modulation du fonctionnement des jonctions GAP entres les cellules gliales de la muqueuse olfactive dans des conditions physiologiques, *ex vivo* et *in vivo* ?

Quelles sont les conséquences fonctionnelles qu'une telle modulation pourrait avoir sur le signal olfactif périphérique ?

I. Introduction

A. Physiologie de l'olfaction

1. Anatomie du système olfactif

Chez les muridés, la sensorialité olfactive est indispensable à de nombreuses fonctions comme par exemple l'alimentation ou les interactions sociales. Le système sensoriel olfactif se compose d'éléments périphériques et de structures cérébrales centrales. Au niveau périphérique, les odeurs sont détectées par un organe récepteur principal, la muqueuse olfactive, située dans la cavité nasale, protégée et cloisonnée : la cavité nasale est séparée de la cavité buccale par la lame horizontale du palatin et l'os nasal constitue le toit de la cavité nasale. Le septum quant à lui est une paroi cartilagineuse qui sépare la cavité nasale en deux. La lame criblée est une paroi poreuse qui sépare le fond de la cavité nasale du système nerveux central. Les parties latérales sont délimitées par les os maxillaires et les masses latérales de l'éthmoïde. Sur les masses latérales de l'ethmoïde se trouvent des excroissances cartilagineuses formant ainsi sept cornets. Ces circonvolutions, recouvertes par la muqueuse olfactive, en augmentent la surface et optimisent ainsi le contact avec l'air (Harkema *et al.*, 2006). **Figure 1**

La fonction de cette muqueuse est de capter et de transmettre les informations chimiques volatiles de l'environnement, en direction des structures olfactives centrales situées dans la boite crânienne, et en tout premier lieu aux bulbes olfactifs (BO), premier relai central. Les BO projettent ensuite leurs informations sur un cortex primaire, le cortex piriforme (Mainland *et al.*, 2014).

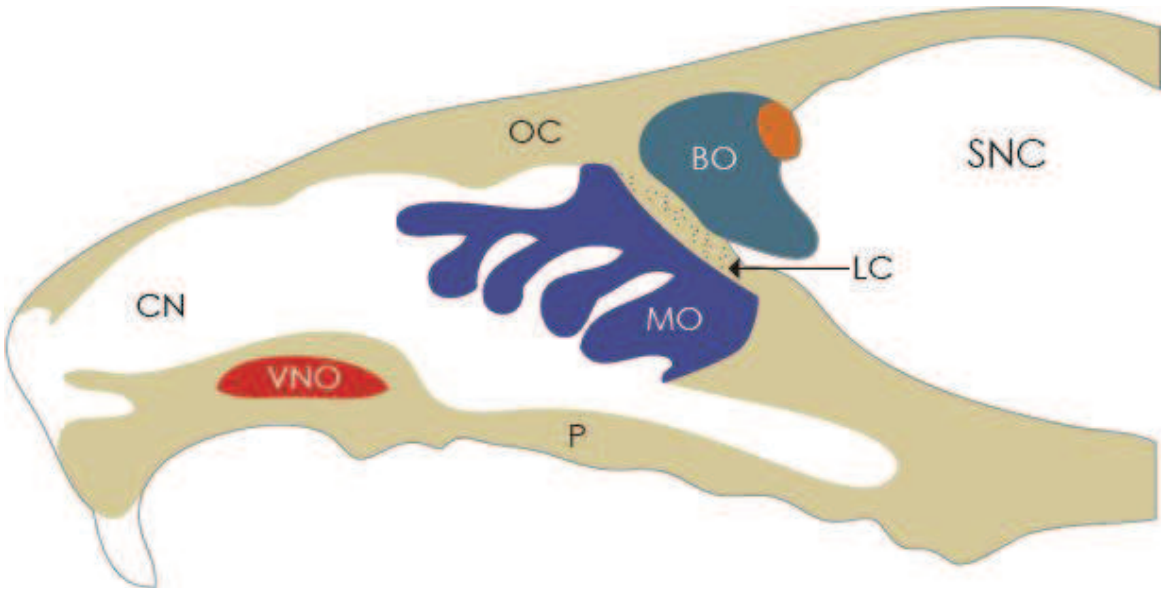


Figure 1. *Organisation général du système olfactif.*

Le schéma révèle l'organisation du système olfactif en vue sagittale. La muqueuse olfactive (MO) et l'organe voméronasal (VNO) se trouvent dans la cavité nasale. Le bulbe olfactif (BO) fait partie du système nerveux central (SNC) situé au sein de la boite crânienne. Les neurones de la MO se projettent dans le BO principal alors que ceux du VNO se projettent dans le BO accessoire, représenté en orange sur le schéma.

CN : cavité nasale / VNO : organe voméronasal / P : palais / MO : muqueuse olfactive principale / OC : os du crane / LC : lame criblée / BO : bulbe olfactif / SNC : système nerveux central

Crédit : LNAcody

La muqueuse olfactive (MO) se caractérise également par sa structure. Elle présente en profondeur une lamina propria, principalement composée de tissu conjonctif. Ce tissu est fortement vascularisé et contient les glandes de Bowman. Ces glandes sécrètent un mucus qui tapisse la muqueuse olfactive. Au-dessus de la lamina propria se trouve une lame basale et l'épithélium olfactif. Il existe deux types d'épithélia dans la cavité nasale : un épithélium respiratoire qui est principalement constitué de cellules ciliées et un épithélium olfactif. **Figure 2.**

L'épithélium respiratoire s'étend sur la partie rostrale du septum et des cornets. Sur la partie caudale, l'épithélium olfactif délimite le territoire olfactif, et se compose de différents types cellulaires décrits ci-dessous.

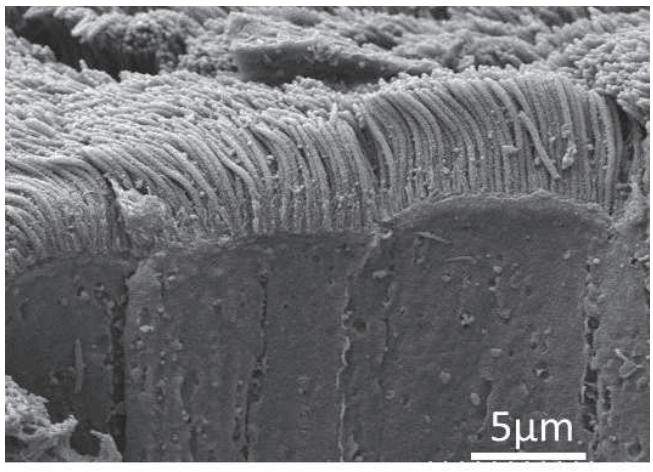


Figure 2. *Photographie de cellules ciliées de muqueuse respiratoire en MEB.*

Crédit : K. Badonnel

2. Organisation du système olfactif périphérique

L'olfaction intervient dans différentes fonctions, allant de la nutrition, l'évitement de prédation à l'ensemble des communications sociales. Ces multiples rôles sont assurés par plusieurs éléments individualisés par leur localisation et leur fonctionnement (Munger *et al.*, 2009). **Figure 1**.

a. L'organe olfactif principal

L'organe olfactif principal constitue l'élément le plus important. Il se retrouve notamment sur les cornets et de chaque côté du septum. Il est caractérisé par la présence des neurones olfactifs. Ces derniers projettent leur axone vers les glomérules du bulbe olfactif principal. Les neurones olfactifs expriment spécialement les récepteurs aux odorants. L'épithélium olfactif principal contient d'autres types cellulaires explicités plus loin dans ce manuscrit. Les champs d'investigations de cette thèse se sont focalisés principalement sur la MO. Je décris néanmoins rapidement, ci-dessous, certains autres éléments périphériques participants à la fonction olfactive.

b. L'organe voméronasal

L'organe voméronasal est un compartiment du système olfactif périphérique dédié à la détection des phéromones (Mucignat-Caretta, 2010). Il se trouve à la base du septum, dans sa moitié rostrale. Différents types de neurones sensoriels y sont présents, certains exprimant des récepteurs aux odorants, d'autres exprimant principalement des récepteurs du type V1R (récepteurs aux phéromones, (Haga-Yamanaka *et al.*, 2014), V2R (récepteurs aux peptides et protéines, (Leinders-Zufall *et al.*, 2014)). Les axones de ces neurones ont pour cible les différentes régions du bulbe olfactif accessoire (Isogai *et al.*, 2011).

c. Autres organes du système olfactif

L'organe septal de Masera et le ganglion de Gruneberg sont deux structures également connues pour participer à la fonction olfactive. Alors que le rôle de l'organe septal de Masera semble participer à la détection de

stimuli mécaniques (Grosmaitre *et al.*, 2007) mais aussi à celle d'odorants, notamment des dérivés soufrés (Duan *et al.*, 2012), le rôle du ganglion de Grueneberg reste discret, bien que des études récentes tendent à montrer que ses neurones répondent à la fois à certains odorants (Mamasuew *et al.*, 2011), au froid (Schmid *et al.*, 2010) et à des odeurs de prédateurs (Brechbuhl *et al.*, 2008; Brechbuhl *et al.*, 2013).

3. Organisation de la muqueuse olfactive

La muqueuse olfactive est composée d'un épithélium olfactif qui repose sur la lame basale. Cette lame basale sépare l'épithélium de la lamina propria. Les principaux types cellulaires qui composent l'épithélium olfactif sont les neurones sensoriels, les SCs, les cellules à microvillosités et les cellules basales. Ces types cellulaires sont répartis à différents niveaux dans l'épaisseur de la muqueuse. **Figure 3a.**

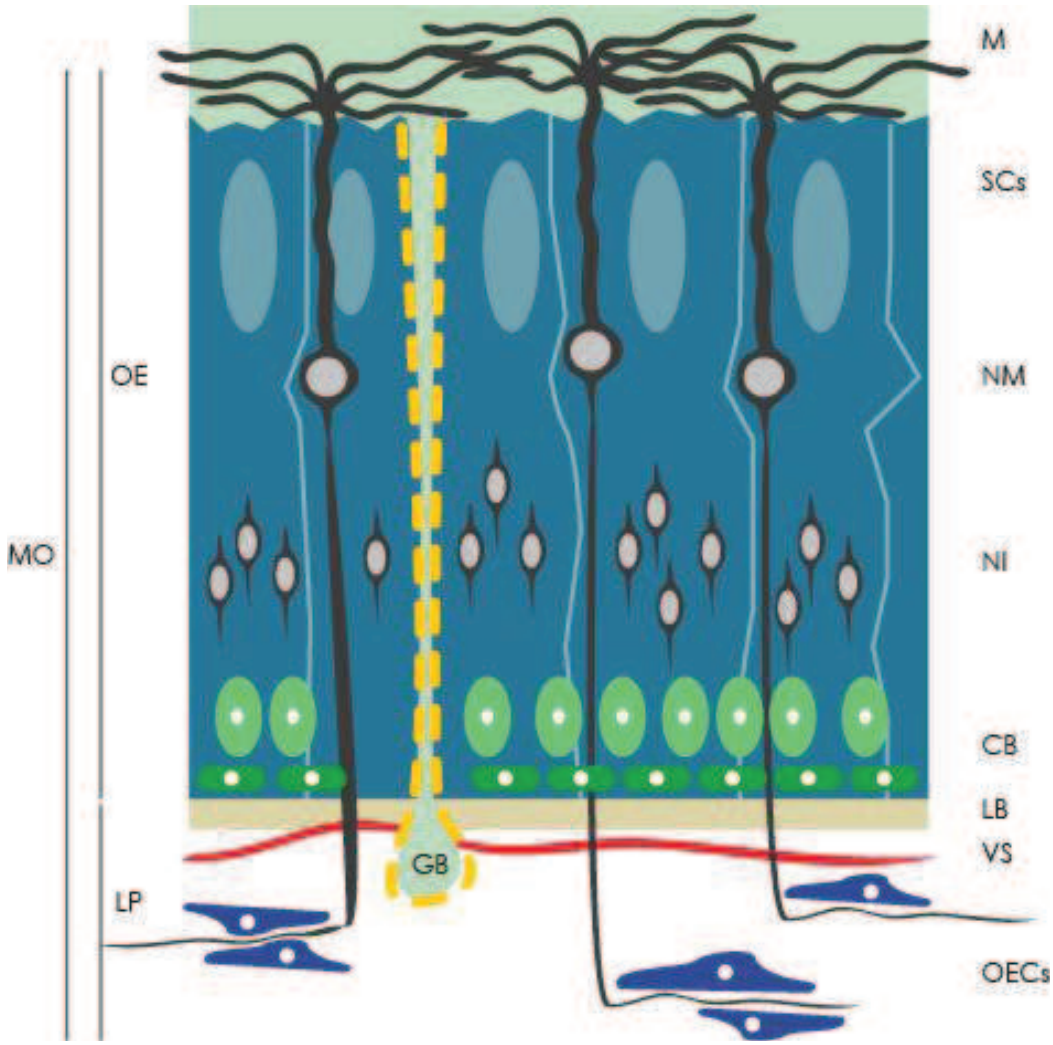


Figure 3a. *Schéma de l'organisation de la muqueuse olfactive.*

La muqueuse olfactive est composée de l'épithélium olfactif et de la lamina propria. Une lame basale sépare les deux.

MO: Muqueuse Olfactive / OE: Epithelium Olfactif / LP: Lamina Propria /GB: Glande de Bowman / M: Mucus / SCs: Cellules de Soutien / NM: Neurones Matures / NI : Neurones Immatures / CB : Cellules Basales (Globulaires et Horizontales) / LB : Lame Basale / VS : Vaisseaux Sanguins / OECs : Cellules engainantes

Image modifiée par LNAcody

L'épithélium olfactif est pseudo stratifié, organisé en six couches qui furent identifiées par des différences d'activités métaboliques (Pataramekin & Meisami, 2005). **Figure 3b.** La couche la plus profonde est composée des cellules basales horizontales. Au-dessus, les cellules basales globulaires et des neurones olfactifs immatures sont présents. La troisième couche est essentiellement constituée par les corps cellulaires des neurones olfactifs matures. La quatrième correspond à celle des SCs (leur corps cellulaire et leur noyau). La cinquième couche comporte l'extrémité apicale des SCs et les dendrites des neurones. La dernière couche contient les cils des neurones olfactifs matures et les microvilli des SCs. A la surface de l'épithélium, les cils des neurones olfactifs baignent dans un mucus : le mucus olfactif. Sécrété par les glandes de Bowman, ce mucus est une substance visqueuse essentiellement constituée d'eau, d'ions et de glycoprotéines (Heydel *et al.*, 2013). Il a un rôle dans l'humidification, le réchauffement et la filtration de l'air. Il a aussi un rôle de protection pour les épithéliums. Il lutte contre le dessèchement, les infections ainsi que les agressions chimiques. Les glandes de Bowman sécrètent en permanence ce mucus et les battements des cils des cellules de l'épithélium respiratoire assurent sa dispersion dans l'ensemble de la muqueuse olfactive. Le mucus contient également des protéines de liaison aux molécules odorantes : les Odorants Binding Proteins (OBP). Elles pourraient participer à la solubilisation des odorants tant en jouant un rôle tampon vis-à-vis de leur concentration et potentiellement aider à leur détoxification, voire interagir avec les récepteurs olfactifs (Heydel *et al.*, 2013). Ces récepteurs aux odorants sont exprimés sur les cils des neurones olfactifs. Les SCs environnent et séparent les dendrites des neurones olfactifs. Chaque neurone olfactif projette un axone à travers la lame basale vers le bulbe olfactif. Dans la lamina propria, en plus de nombreux vaisseaux sanguins et de fibroblastes, se retrouvent les cellules engainantes. Ces cellules gliales engainent les axones des neurones olfactifs de la muqueuse olfactive jusqu'aux bulbes olfactifs.

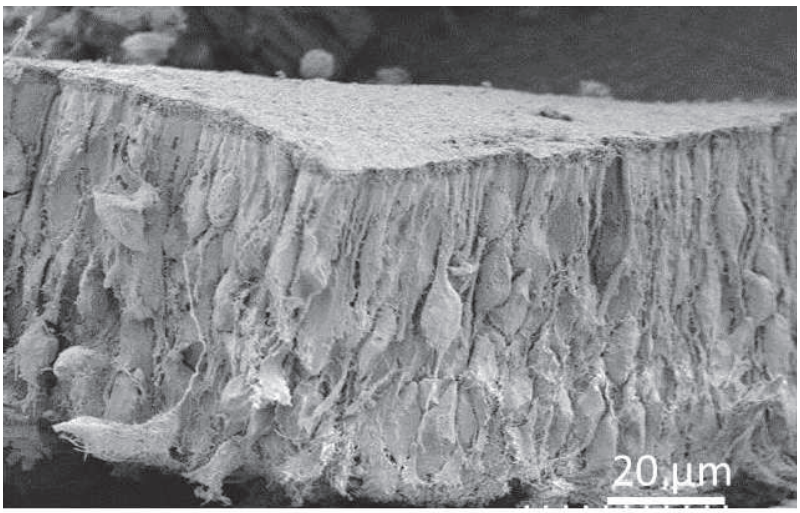


Figure 3b. *Photographie de l'épithélium olfactif de rat en MEB.*

Section de l'épithelium olfactifs où les corps cellulaires des neurones olfactifs sont agencés en couche et leur dendrites se prolongent entre les cellules de soutiens vers le pole apical.

Crédit : K. Badonnel

a. Neurones olfactifs

Les neurones olfactifs sont des cellules bipolaires, d'un diamètre d'environ 5µm. Du coté apical, une dendrite se prolonge par un bouton dendritique dont une dizaine de cils émergent. **Figure 4.** Ces derniers baignent dans le mucus et s'étendent sur plus de 50 µm à la surface de l'épithélium. A leur base, les neurones émettent un axone non myélinisé qui va rejoindre les axones d'autres neurones sensoriels en un faisceau. Protégés par des cellules engainantes, les axones traversent la lame criblée de l'ethmoïde et font synapse au niveau des bulbes olfactifs. Les synapses des neurones récepteurs avec les cellules mitrales, premier relai de l'information olfactive au sein du système nerveux central, se font au sein de structures sphériques appelées glomérules. Les glomérules contiennent uniquement des ramifications dendritiques et axonales, et quelques astrocytes. La durée de vie des neurones récepteurs est estimée à environ 30 jours. Un renouvellement permanent est assuré au sein de la muqueuse olfactive, à partir des cellules basales ; ainsi un gradient de maturité des neurones olfactifs s'opère dans l'épaisseur de la muqueuse de la profondeur vers la surface.

Des milliers de récepteurs différents sont impliqués dans la détection des odorants. Les travaux de Linda Buck et de Richard Axel en 1991, par le clonage des récepteurs olfactifs, ont ouvert la voie à la compréhension du codage olfactif (Buck & Axel, 1991). L'attribution du prix Nobel de médecine en 2004 est venue récompenser ces travaux. Les récepteurs aux odorants sont exprimés à la membrane des cils des neurones olfactifs. Canoniquement, un neurone olfactif n'exprime qu'un seul récepteur parmi plus de 1000 chez la souris (Zhang & Firestein, 2002). Il existe au sein de l'épithélium olfactif une distribution régionalisée des différentes familles de neurones olfactifs (Ressler *et al.*, 1993). Les neurones olfactifs exprimant le même récepteur projettent leurs axones vers un ou deux glomérules parmi plus de 2000 du bulbe olfactif principal. Les récepteurs aux odorants peuvent avoir un large spectre d'affinités ou peuvent faire preuve d'une très forte discrimination (Malnic *et al.*, 1999).

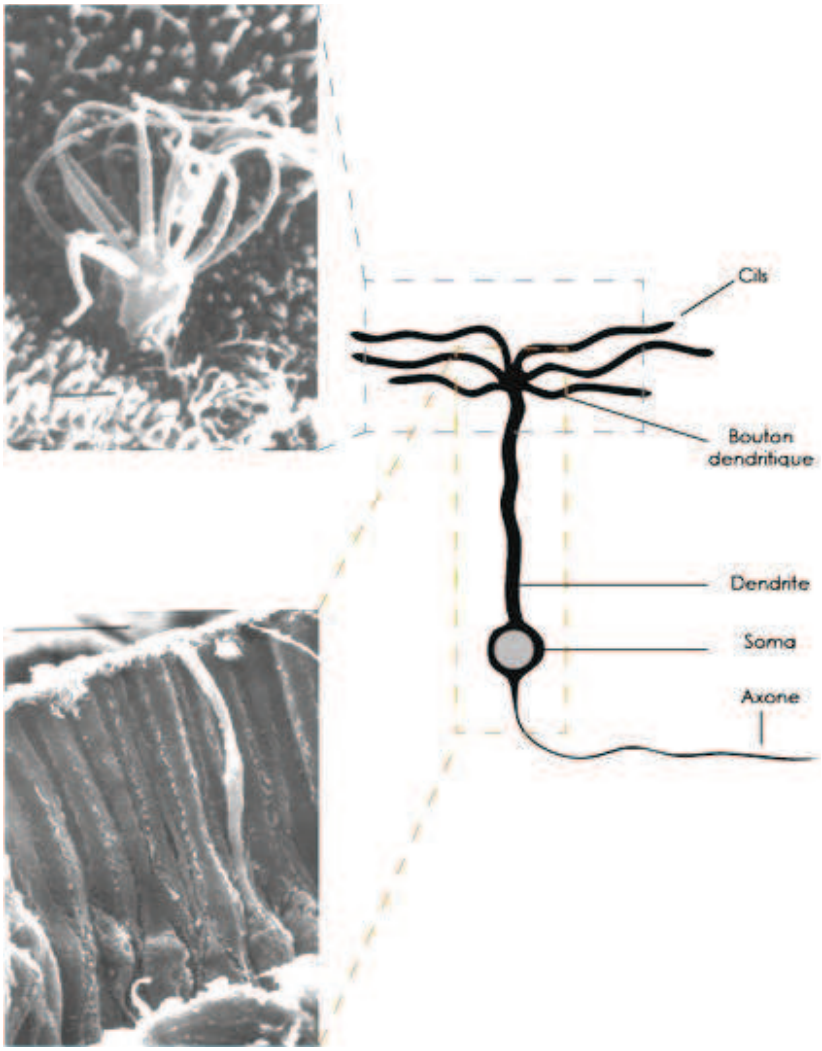


Figure 4. *Schéma et photographies de neurones olfactifs.*

Les récepteurs olfactifs sont situés sur les cils, lieu de la transduction du signal. Le message est conduit du bouton dentritique au soma par le dentrite. Le potentiel d'action généré transite alors le long de l'axone.

D'après Schild et Restrepo, 1998 et modifié par LNAcody

Ce codage populationnel permet à partir d'une variété limitée de récepteurs d'obtenir un encodage combinatoire quasi illimité de toutes les formes moléculaires possibles.

Il existe toutefois d'autres types de neurones sensoriels au sein du système olfactif comme les neurones exprimant un récepteur TAAR (Trace amine-associated receptor) (Liberles & Buck, 2006). Ils représentent une minorité des neurones présents. Ils sont impliqués dans la reconnaissance des odeurs de communication et d'informations sociales.

La voie de transduction classique pour les neurones olfactifs est la voie de l'AMPc. D'autres neurones olfactifs expriment un récepteur GC-D (The receptor guanylyl cyclase type D) qui implique une voie de transduction reliée à une guanylate cyclase ((Leinders-Zufall *et al.*, 2007)). Une sous population de neurones sensoriels exprime également des canaux TRP (transient receptor potential) (Elsaesser *et al.*, 2005). Leur fonction reste à élucider.

b. Cellules basales

Deux types de cellules basales sont présents au sein de la muqueuse olfactive : les cellules basales horizontales et les cellules basales globulaires. Les cellules basales horizontales se situent juste au-dessus de la lame basale de l'épithélium olfactif. Elles expriment des cytokératines, des filaments intermédiaires et des tonofilaments caractéristiques des cellules épithéliales prolifératives. Les cellules basales globulaires sont situées au-dessus, entre les cellules basales horizontales et les corps cellulaires des neurones olfactifs immatures. Ces cellules multipotentes ont une forte prolifération. Elles subissent un renouvellement fonctionnel tout au long de la vie, ce qui conduit à une régénération constante des neurones, des SCs et des cellules engainantes (Beites *et al.*, 2005). Ces processus sont sous le contrôle de nombreux facteurs de croissance (Mackay-Sima & Chuahb, 2000; Hansel *et al.*, 2001b). Par le jeu de ces différents facteurs, les cellules progénitrices vont passer par différents stades avant de devenir des précurseurs neuronaux. Ces

précurseurs neuronaux vont d'abord se diviser, ensuite se différencier en neurones olfactifs immatures puis matures (Caggiano *et al.*, 1994).

c. Cellules de soutien

i. *Caractéristiques morphologiques*

L'épithélium olfactif est fonctionnellement défini par les propriétés de détection des odorants par les neurones olfactifs. Cependant, les cellules de soutien, nommées également cellules sustentaculaires (SCs) constituent une population importante des cellules résidentes de cet épithélium qui a été beaucoup moins étudiée. Les SCs sont des cellules bipolaires qui s'étirent de la lame basale jusqu'à la surface de l'épithélium olfactif. En effet, du côté apical leurs corps cellulaires contenant leurs noyaux forment une monocouche qui représente la quasi-intégralité de la surface de l'épithélium (Vogalis *et al.*, 2005a). A leur surface elles portent des microvilli qui permettent des échanges avec le mucus (Pixley *et al.*, 1997). **Figure 5a.** Cette partie apicale des SCs isole de façon serrée les dendrites des neurones olfactifs. Les prolongements des SCs du côté basal s'insinuent entre les autres types cellulaires, de la couche des neurones jusqu'à la lame basale. Les SCs de l'épithélium principal ou de l'organe voméronasal semblent présenter les mêmes caractéristiques, (Ghiaroni *et al.*, 2003). **Figure 5b.**

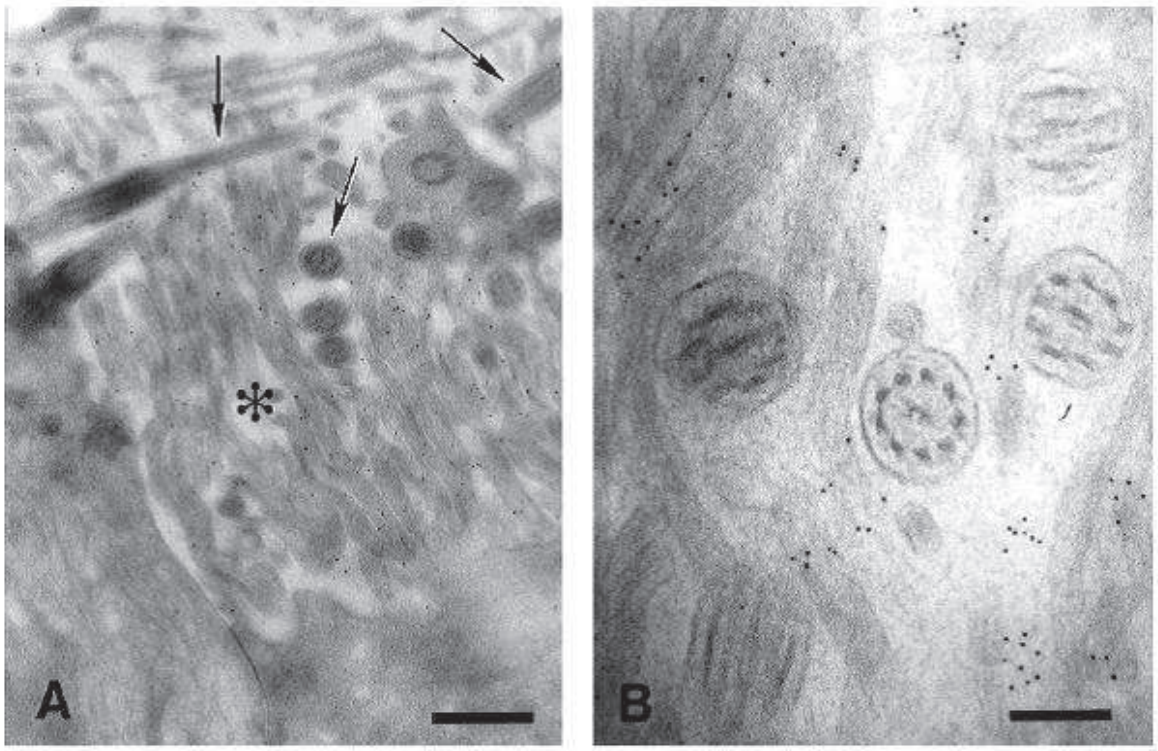


Figure 5a. *Photographies en MET des microvilli des SCs.*

On note ici la présence de structures caractéristiques de microvilli au sein des cellules de soutien.

Crédit : Pixley et al., 1997

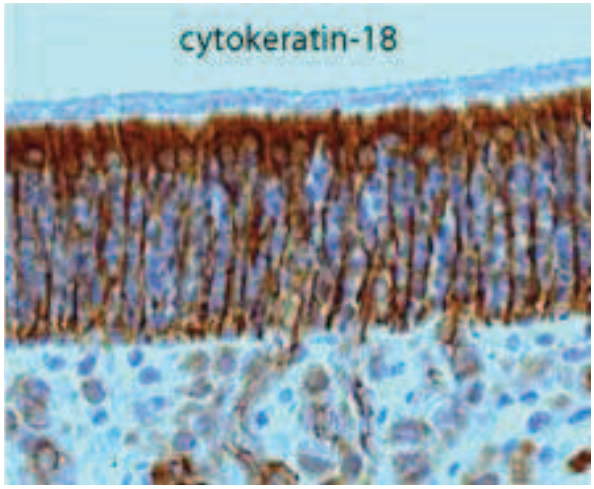


Figure 5b. *Immunomarquage contre la cytokératine 18 dans les SCs.*

Crédit : SK. Williams et al., 2004

ii. *Caractéristiques fonctionnelles*

A la différence des neurones olfactifs, les SCs ne sont pas capables de générer de potentiels d'action (Verkhratsky & Steinhauser, 2000), et présentent des propriétés membranaires plutôt proches de celles des cellules gliales : large capacitance, faible résistance membranaire, important courant de fuite et large conductance potassique sortante (Vogalis *et al.*, 2005b). Fonctionnellement, les SCs partagent des caractéristiques communes avec les cellules gliales et les cellules épithéliales et ont des rôles similaires dans l'épithélium. Elles assurent l'homéostasie des neurones olfactifs et les protègent des agressions toxiques provenant du milieu extérieur. Les SCs sont également connus pour être impliquées dans la sécrétion de mucus, la détoxification, les phénomènes de phagocytose des cellules mortes (Getchell & Getchell, 1992). Elles participent donc à la gestion des populations cellulaires, produisent aussi des facteurs de croissance à destination des neurones olfactifs en développement (Menco & Morrison, 2003).

Une étude sur tranche de muqueuse olfactive de souris a permis de mettre en évidence que les SCs émettent des signaux calciques identiques à ceux des cellules gliales du système nerveux central (Hegg *et al.*, 2009).

iii. *Cellules de soutien et jonctions GAP*

Plusieurs études sur des modèles animaux différents ont montré que les SCs sont électriquement couplées. Chez la grenouille, la notion de couplage électrique par jonction GAP est évoquée entre SCs (Trotier, 1998). Des études chez la souris ont montré une immunoréactivité contre la connexine 43 (Cx43) dans les SCs de l'épithélium olfactif (Miragall *et al.*, 1992). L'expression de connexines dans les SCs a été confirmée en utilisant le marqueur LacZ dirigée par le promoteur Cx43 (Zhang *et al.*, 2000). Il a été démontré la présence de sous-unités Cx45 dans la région des SCs au sein de l'épithélium olfactif (Zhang & Restrepo, 2002). Grâce à une étude électrophysiologique approfondie (Vogalis *et al.*, 2005b), le couplage entre SCs par jonction GAP ne fait plus aucun doute.

iv. *Cellules de soutien et ATP*

Il est maintenant admis que les modulations d'un système sensoriel impliquent des cellules non-neuronales (Pack & Pawson, 2010). La muqueuse olfactive est l'un des systèmes sensoriels le plus régulé, en raison de ses capacités de régénération soutenues (Schwob, 2002). De plus en plus d'études, chez les mammifères comme chez les amphibiens, mettent en évidence un nombre croissant de facteurs impliqués dans les processus de neuromodulation au niveau de la muqueuse olfactive (la dopamine, l'insuline, l'acétylcholine, le NPY, les endocannabinoïdes…); (Hegg & Lucero, 2004; Czesnik *et al.*, 2007; Lacroix *et al.*, 2008; Negroni *et al.*, 2012). Par ailleurs, une partie des modulations autocrine, paracrine ou endocrine implique des cellules non-neuronales (Lucero, 2013).

Les nucléotides purinergiques, comme l'ATP (adénosine triphosphate), sont des neuromodulateurs importants des systèmes sensoriels périphériques. Une application d'ATP sur des tranches de muqueuse olfactive aboutit à une diminution des réponses neuronales aux odorants. Cette modulation par l'ATP pourrait aussi bien passer par les neurones olfactifs que par les SCs car différents types de récepteurs purinergiques sont exprimés par les deux types cellulaires (Hegg *et al.*, 2003). Au niveau des SCs, l'ATP induit de surcroît une réponse calcique rapide (Hegg *et al.*, 2009). Cette étude, qui est d'ailleurs la seule décrivant l'activité de ces SCs en imagerie calcique, décrit deux types de signaux calciques :

- Des « ondes » de calcium intercellulaire où les élévations du calcium se propagent entre les cellules voisines avec l'implication de jonctions GAP

- Des oscillations répétitives de calcium intracellulaire dans des cellules individuelles.

Les SCs sont donc comme les cellules gliales dans le système nerveux central : elles présentent une signalisation calcique complexe. Ces résultats

viennent renforcer l'idée d'un rôle important des SCs dans la communication avec les neurones. **Figure 6.**

v. *Cellules de soutien et endothéline*

Des nombreuses modulations par messagers nerveux, endocrines ou paracrines interviennent au sein de la muqueuse olfactive (Lucero, 2013). En plus des signaux déjà évoqués précédemment, les recherches effectuées au laboratoire NBO ont montré que des peptides vasoactifs avaient un rôle important dans ce tissu. La vasopressine génère des réponses calciques robustes et dose-dépendante dans les cellules de la muqueuse olfactive en culture primaire (Levasseur *et al.*, 2004). De même, l'endothéline (ET-1), un peptide vasoconstricteur, largement décrit plus loin dans ce manuscrit, est connu pour ces actions pléiotropes notamment sur le système nerveux. Une étude effectuée sur des embryons humains de 11 semaines a permis de montrer que les neurones à GnRH issus des placodes olfactives sont sensibles à l'ET-1 (Maggi *et al.*, 2000), sensibilité encore bien présente au sein de culture primaire d'épithélium olfactif de rat (Gouadon *et al.*, 2010). Ces études suggèrent des rôles inattendus de peptides vasoactifs, en particulier l'ET-1, dans le système olfactif. Pour cette raison, des études sur le rôle de ce peptide au sein de la muqueuse olfactive ont été menées au laboratoire. Mes collègues ont démontré que les différents composés du système endothéline sont exprimés par les différentes cellules de la MO en culture primaire. Ce peptide génère en outre une forte réponse calcique dans les cellules non-neuronales, dont les SCs (Gouadon *et al.*, 2010). Dans différents tissus nerveux, l'ET-1 est un facteur anti-apoptotique (Siren *et al.*, 2002). *In vitro* et *in vivo*, cet effet est également retrouvé sur les cellules neuronales et non neuronales de la muqueuse olfactive (Laziz *et al.*, 2011; Francois *et al.*, 2013).

Enfin, il est intéressant de noter que l'endothéline est connue pour son rôle de découplant des jonctions GAP des cellules gliales du système nerveux central (Blomstrand *et al.*, 2004).

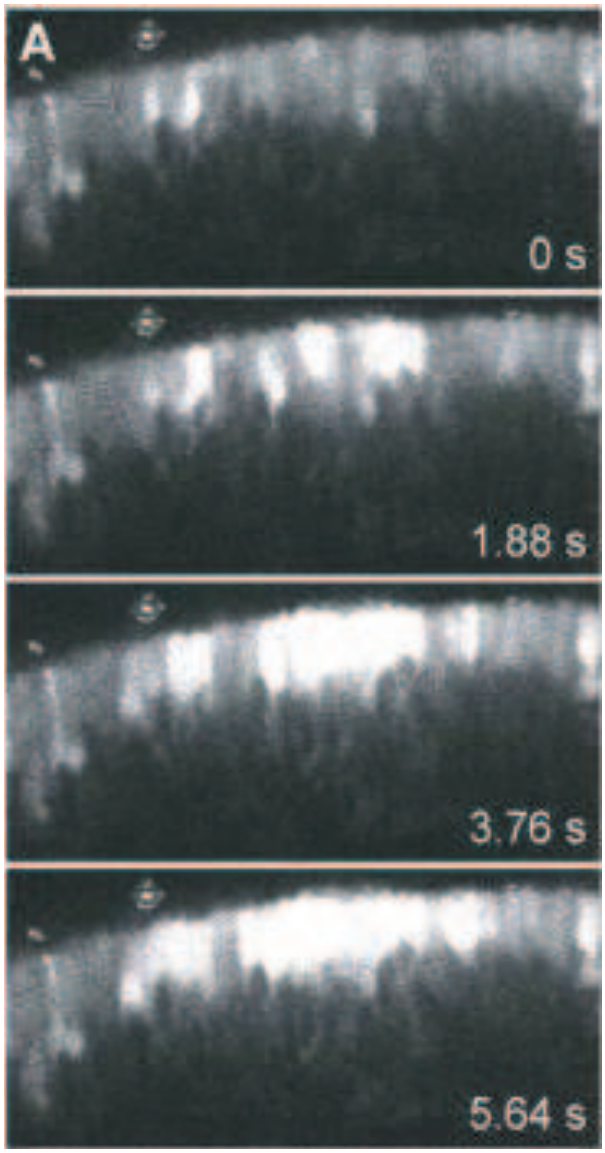


Figure 6. *Réponse Calcique des SCs de la MO.*

Série d'images acquises pendant une vague de calcium intercellulaire spontanée au sein de cellules de soutien dans une tranche de MO.

Crédits : Hegg et al., 2009

Les SCs étant également couplées par des jonctions GAP, il apparaissait donc, à ce stade, tout à fait envisageable qu'à court terme l'endothéline puisse agir sur l'état de connectivité du réseau des SCs dans la MO.

d. Cellules engainantes

i. *Caractéristiques morphologiques*

La plupart des cellules engainantes (OECs) présentent une morphologie allongée et étendent des processus laminaires minces qui engainent les nerfs olfactifs(Ramon-Cueto & Avila, 1998). La population cellulaire d'OECs est renouvelée grâce aux cellules basales globulaires qui prolifèrent (Goldstein & Schwob, 1996).Initialement, les OECs étaient considérées comme des cellules de Schwann du système olfactif en raison de leur emplacement entre la muqueuse olfactive et le bulbe olfactif (Gasser, 1956). De plus, les OECs partagent de nombreuses propriétés proches de celles des cellules de Schwann, comme l'expression du marqueur p75NTR (p75 neurotrophinreceptor) (Wewetzer *et al.*, 2002). Ces cellules gliales olfactives expriment par ailleurs la GFAP (Glial fibrillary acidic protein) suggérant également une ressemblance avec les astrocytes (Barber & Lindsay, 1982). Cependant, il est vite devenu évident que les OECs sont un type de cellules gliales distinct, partageant des propriétés moléculaires, cellulaires et fonctionnelles aussi bien avec les cellules de Schwann qu'avec les astrocytes.Les OECs possèdent un cytosquelette unique et présentent de remarquables propriétés de mobilité (Huang *et al.*, 2008) et de plasticité morphologique (Vincent *et al.*, 2003). Il a été montré des différences de niveau d'expression des marqueurs tels que p75NTR, S100β (S100 calcium binding protein), GFAP entre les OECs et les autres cellules gliales du système nerveux central. Les profils de transcription des OECs, des cellules de Schwann et des astrocytes semblent indiquer que les cellules de Schwann et les OECs partagent beaucoup plus de choses ensemble qu'avec les astrocytes (Vincent *et al.*, 2005). **Figure 7.**

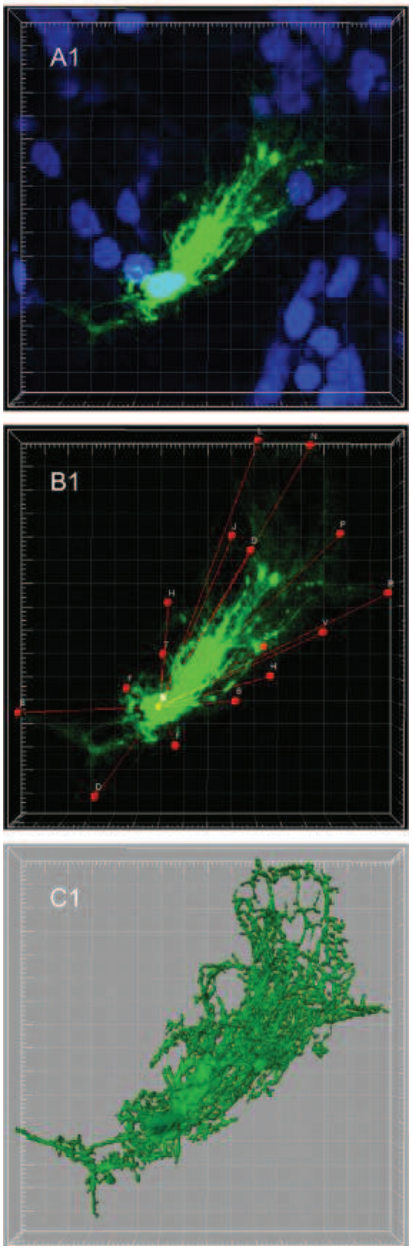


Figure 7. *Structure des cellules engainantes.*

Les OEC sont des cellules allongées avec de fins prolongements formant une matrice.
A, marquage en vert d'une OEC
B, points rouges permettent d'estimer la longueur de projections OEC
C, Modélisation du volume de l'OEC

Crédits : Rela et al., 2011

De plus, il existe toujours un débat sur l'existence de sous types d'OECs selon leur localisation. Bien que partageant des caractéristiques communes en termes de proportions, de morphologies et de capacités prolifératives (Jani & Raisman, 2004; Richter *et al.*, 2008), les OECs de la muqueuse olfactive et des bulbes olfactifs seraient deux populations distinguables.

En plus de cette vaste plasticité morphologique, les OECs présentent une diversité fonctionnelle.

ii. *Caractéristiques fonctionnelles*

Les cellules gliales guident la migration neuronale dans le développement précoce, participent à la formation des synapses et la transmission synaptique, régulent le système vasculaire et la barrière hémato-encéphalique, modulent la neuro-immunité, et jouent un rôle essentiel dans la régénération neuronale (Lohr *et al.*, 2011). Les OECs, cellules gliales de la muqueuse olfactives, présentent également ces caractéristiques (Thyssen *et al.*, 2010).

Les OECs s'étendent pour envelopper les faisceaux d'axones des neurones olfactifs et les acheminer vers le bulbe olfactif (Doucette, 1984). Il est généralement admis que les OECs contribuent à la croissance et au guidage des axones olfactifs au cours du développement ainsi qu'au renouvellement des neurones olfactifs (Li *et al.*, 2005).

La capacité migratrice des OECs est importante pour le développement et la régénération du système olfactif. En outre, la migration des OECs est probablement calcium-dépendante, comme cela a été montré dans le système olfactif des insectes (Lohr & Deitmer, 2006).

Les OECs sont également connues pour leur capacité à sécréter de nombreux facteurs trophiques au sein de la muqueuse olfactive (Woodhall *et al.*, 2001; Chuah & West, 2002). Cette variété de facteurs neurotrophiques serait responsable de leurs propriétés favorisant la croissance des axones (Carter *et al.*, 2004). Certains de ces facteurs de croissance ont été proposés

pour participer à la régulation de la neurogenèse olfactive comme le FGF (Fibroblast Growth Factor) ou encore l'IGF (insulin-like Growth Factor) ((Chuah & Teague, 1999; Woodhall *et al.*, 2001).

Les OECs possèdent également une fonction immunitaire. Le système olfactif est une structure unique, dans lequel le tissu neural est en contact direct avec l'environnement extérieur. Exposé à l'air, il existe donc un risque important d'infiltration de pathogènes. En plus des facteurs trophiques exprimés, les OECs expriment également un certain nombre de facteurs de l'immunité innée (lysozymes, chimiokines, protéines chimiotactiques des monocytes) (Vincent *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2013).

Sur la base de leurs capacités de régénération, les OECs ont émergé comme des candidats de choix pour les stratégies de transplantation cellulaire pour la réparation des lésions nerveuses. Il existe une grande diversité d'applications thérapeutiques envisagées pour les OECs : lésions de la moelle épinière, accident vasculaire cérébral, maladies dégénératives, blessures du système nerveux périphérique… Un grand pan de la littérature sur ces cellules se consacre d'ailleurs à ces propriétés (Ekberg & St John, 2014).

iii. *Cellules engainantes et jonctions GAP*

Les OECs expriment les connexines 26, 32, 37, 43 et 46. Ce profil d'expression des OECs semblent là encore plus proche de celui des cellules Schwann que de celui des astrocytes. Cette présence de transcrits de connexines dans les OECs est cohérente avec des expériences de transferts de Lucifer Yellow réalisées sur cultures primaires d'OECs (Barnett *et al.*, 2001). Ces données *in vitro* ont été confirmé *ex vivo* sur des tranches de bulbes olfactifs, par des techniques d'électrophysiologies et d'imagerie (Rela *et al.*, 2010). Dans cette dernière étude, les auteurs ont pu montrer que les OECs du bulbe présentent une connectivité électrique à travers des jonctions GAP, modulables de façon pharmacologique. **Figure 8.**

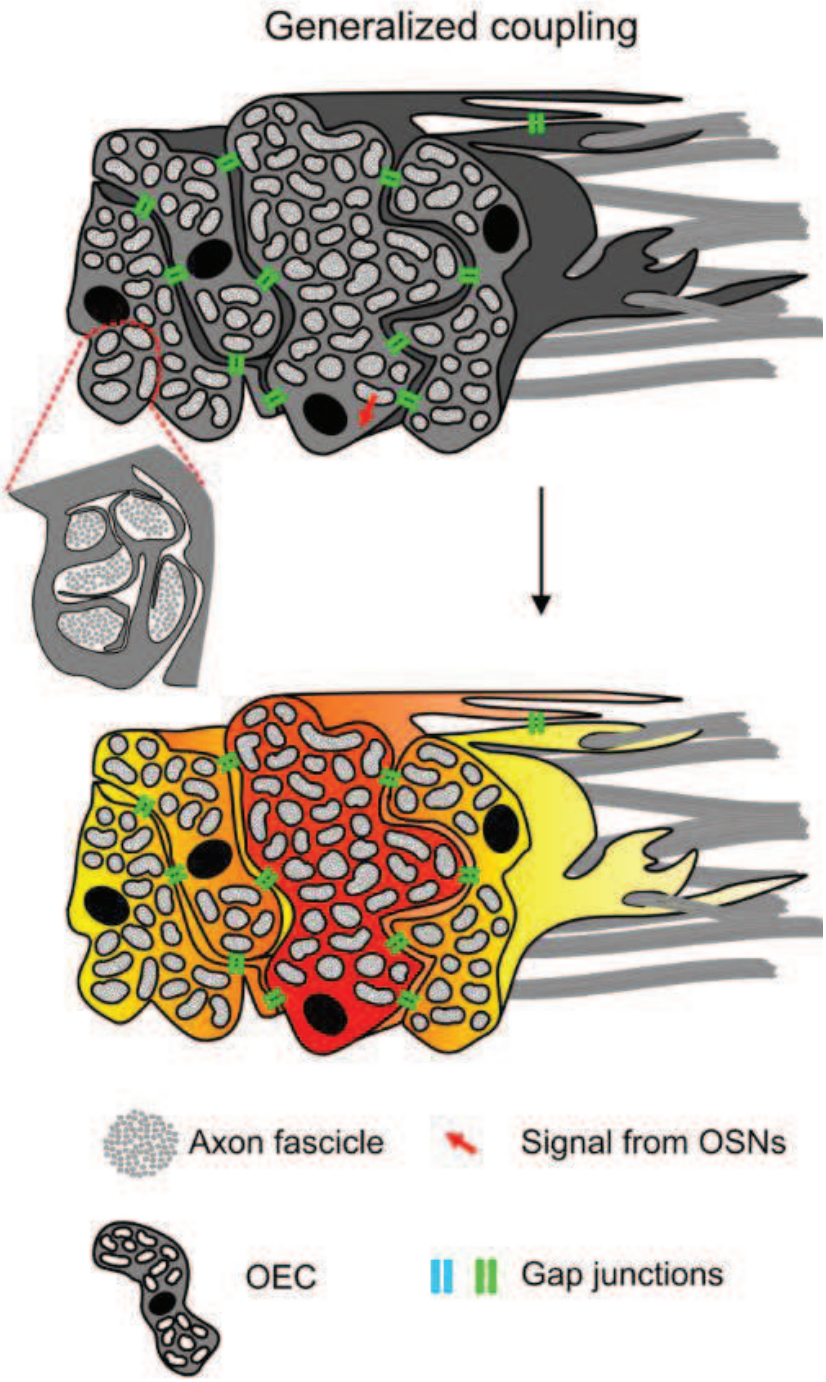


Figure 8. *Schéma illustrant la connectivité et la structures des OECs.*

Les OECs sont connectées entre elles via les jonctions GAP et engainent plusieurs faisceaux d'axones provenant de neurones olfactifs différents. L'activation au sein d'un faisceau nerveux peut alors se répercuter sur l'OECs concernée et induire une activation qui va se propager de proche en proche.

Crédit : Rela et al., 2011

Ces études démontrent clairement l'existence d'un couplage par jonctions GAP des OECs du bulbe olfactifs avec une incidence au moins hémodynamique. Alors que les OECs de la muqueuse olfactive différent de la population du bulbe olfactive, partagent elles ces propriétés de couplage jonctionnel ?

iv. *Cellules engainantes et ATP*

La première étude à démontrer l'importance physiologique de la signalisation purinergique dans le bulbe olfactif a été réalisée sur les OECs (Rieger *et al.*, 2007). Cette étude a permis notamment de montrer que les OECs expriment des récepteurs purinergiques (principalement P2Y1) et répondent à des stimulations à l'ATP par des augmentations calciques. Une étude récente a démontré que la signalisation calcique purinergique ne se produit pas dans toutes les OECs du bulbe olfactif (Thyssen *et al.*, 2013). Il existerait une hétérogénéité de réponse en fonction de la localisation des cellules. La même équipe avait déjà montré que l'ATP est libérée le long des axones des neurones olfactifs, aboutissant à la modulation neuro-vasculaire par les OECs (Thyssen *et al.*, 2010). Une revue récente (Lohr *et al.*, 2014) expose la relation entre système purinergique et cellules gliales dans les systèmes périphériques. Il existe cependant peu de données sur les profils de réponse des OECs de la muqueuse olfactive à l'ATP. Toutefois, comme les SCs, les OECs sont sous l'influence des signaux purinergiques, impliquant une voie calcique.

v. *Cellules engainantes et endothéline*

Comme pour les SCs, il existe peu de données dans la littérature concernant les effets de l'endothéline sur les OECs. Deux approches ont montré que les OECs sont sensibles à l'ET-1. En effet, les OECs de bulbes olfactifs présentent une plasticité morphologique rapide et réversible après l'addition d'ET-1 dans le milieu de culture (Vincent *et al.*, 2003). De plus, des

expériences *in vitro* ont permis de montrer que les cellules non-neuronales, dont les OECs, répondent de façon calcium-dépendante à l'endothéline (Gouadon *et al.*, 2010). Nous avons vu que l'ET-1 est un facteur anti-apoptotique pour les cellules non-neuronales de la muqueuse olfactive (Laziz *et al.*, 2011; Francois *et al.*, 2013). Tout comme pour les SCs, l'étude des effets à court et long terme de l'ET-1 sur les OECs semble nécessaire.

4. Transduction du signal sensoriel

La transduction du signal sensoriel consiste en un changement de modalité lors de la transmission de l'information. Pour l'olfaction, l'information détectée par les cellules réceptrices arrive sous une forme chimique, les molécules odorantes. Cette information va être transformée puis transmise sous la forme de signaux électriques, les potentiels d'action. Les neurones olfactifs constituent le siège de cette transduction (Mainland *et al.*, 2014).

a. Nature et acheminement des stimuli olfactifs

Généralement, les signaux olfactifs se composent d'un mélange complexe de molécules odorantes. Ces composés chimiques, le plus souvent volatils, présentent une grande diversité de structures et de fonctions chimiques (aldéhydes, alcools ou esters). La volatilité et la solubilité dans le mucus des molécules odorantes sont deux propriétés physiques importantes pour la perception.

Lors de la respiration, les stimuli odorants sont conduits dans la cavité nasale par l'inspiration. L'optimisation du contact entre les molécules odorantes avec les circonvolutions de la muqueuse olfactive permet d'assurer la perception des stimuli odorants. Le mucus et les OBP, sécrétées dans le mucus, interviennent dans la sensibilité des récepteurs pour les odorants (Heydel *et al.*, 2013). Ces paramètres influent sur la disponibilité des molécules odorantes ainsi sur l'accès aux récepteurs olfactifs. La fixation des molécules odorantes sur les récepteurs au niveau des cils olfactifs, déclenche

une chaine de réactions conduisant à la transmission de l'information olfactive par les neurones olfactifs de la MO vers le BO.

b. Voie de transduction

La voie de transduction impliquant la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), second messager intracellulaire, est la voie majoritairement utilisée au sein de la muqueuse olfactive. Les récepteurs olfactifs sont des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR). Ils se composent donc de 7 domaines transmembranaires. La fixation d'un odorant à ce récepteur entraîne une cascade de transduction débutant par l'activation et la phosphorylation de la protéine Ga_{olf}. Cette dernière active alors l'adenylyl cyclase de type III (ACIII), responsable de la formation d'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc se lie et induit l'ouverture d'un canal activé par des nucléotides cycliques (CNG), provoquant une entrée d'ions, principalement d'ions Ca^{2+}. Ces ions calcium vont à leur tour provoquer l'ouverture de canaux chlore calcium-dépendants et induire une sortie d'ions Cl-. Ces canaux ont souvent été décrits comme indispensables à la transduction du message olfactif en amplifiant la dépolarisation du neurone olfactif. Une controverse récente existe néanmoins sur le fait que ces canaux pourraient être accessoires à la transduction (Billig *et al.*, 2011). Toutefois, si la dépolarisation atteint un seuil d'activation, des potentiels d'action vont être générés par l'intervention de canaux sodium voltages dépendants. Une boucle de rétrocontrôle module la réponse olfactive. Elle implique la fermeture des CNG, l'inactivation de l'ACIII et la dégradation de l'AMPc par des phosphodiestérases (Matthews & Reisert, 2003). **Figure 9.**

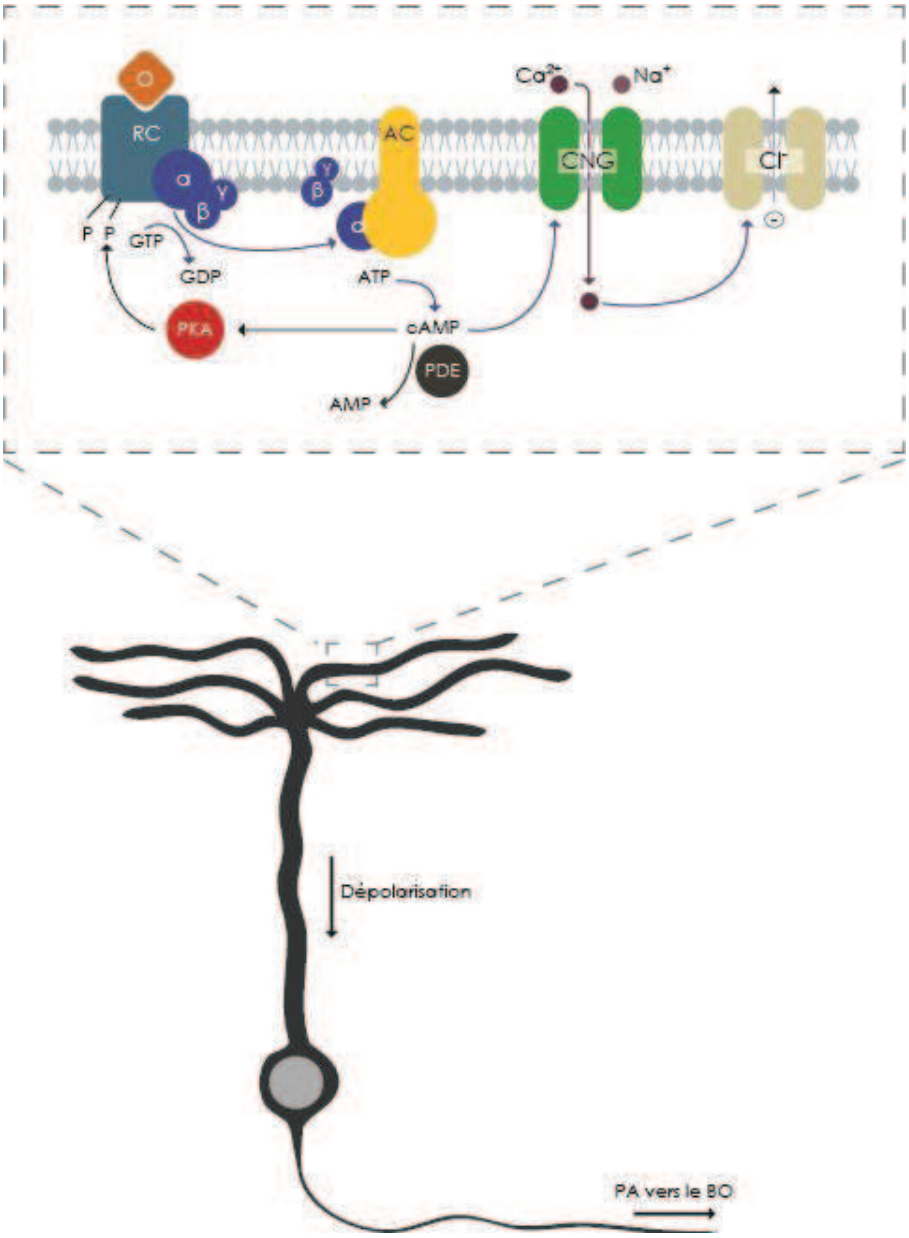


Figure 9. *Schéma de la voie de transduction olfactive.*

Suite à la fixation de la molécule odorante (o), le récepteur olfactif (RC) active une protéine G_{olf} (αβγ). Elle entraine l'activation d'une adénylyl cyclase (AC) pour transformer l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'AMPc va se fixer à un canal CNG provoquant une entrée d'ions calcium (Ca^{2+}) et sodium (Na^{+}). Les ions Ca^{2+} vont activer un autre canal qui va laisser sortir des ions chloride (Cl^{-}) pour amplifier la dépolarisation. Un rétrocontrôle s'opère par la protéine kinase A, activée par l'AMPc et inactivant le RO par phosphorylation. La phosphodiesterase (PDE) assure la terminaison du signal en dégradant l'AMPc.

Crédit : LNAcody modifiée à partir de Munger et al., 2009

D'autres voies non canoniques existent au sein de la muqueuse olfactive. La voie de transduction impliquant la phospholipase C(PLC), la phosphatidyl-inositol biphosphate (PIP2), l'inositol triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). Une entrée d'ions calcium dans le milieu intracellulaire induit la dépolarisation du neurone. Cette voie est retrouvée essentiellement dans les neurones sensoriels de l'organe voméronasal (Holy *et al.*, 2000). Il existe également une voie de transduction impliquant le GMPc (Liu *et al.*, 2009).

L'information olfactive se propage donc sous forme de potentiels d'actions le long des axones des neurones olfactifs, qui après avoir traversé la lame criblée de l'éthmoïde, font synapse avec les cellules mitrales dans le bulbe olfactif.

5. De la périphérie au système nerveux central

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

a. Organisation du bulbe olfactif

Le bulbe olfactif est organisé en cinq couches concentriques. La couche la plus externe des nerfs olfactifs est principalement constituée des axones des neurones olfactifs et de cellules engainantes. La couche suivante contient les glomérules. Les glomérules sont des structures constituées par les axones des neurones olfactifs, les dendrites des cellules mitrales et des cellules à panache, et d'astrocytes, entourés de cellules juxtaglomérulaires qui forment des synapses inhibitrices GABAergiques et s'étendent entre plusieurs glomérules. Se présente ensuite la couche plexiforme externe, comprenant surtout les corps cellulaires des cellules à panache. Puis la couche des cellules mitrales qui, avec les cellules à panache, sont les cellules de sortie du bulbe olfactif. Elles émettent des projections regroupées au sein du tractus olfactif latéral, vers les structures centrales d'intégration que sont le cortex piriforme,

le noyau olfactif latéral, le tubercule olfactif, l'amygdale, et l'hypothalamus latéral. Enfin, on trouve l'épaisse couche contenant les cellules granulaires, interneurones inhibiteurs des cellules mitrales (Mainland *et al.*, 2014). **Figure 10a.**

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

Chez les mammifères, chaque neurone récepteur olfactif va projeter son axone dans un unique glomérule. Les neurones exprimant le même récepteur olfactif, isorécepteur, convergent vers le même glomérule. Une étude a montré que jusqu'à 25000 neurones sensoriels projettent dans un même glomérule (Mombaerts *et al.*, 1996). Cette organisation est à la base d'un codage spatial de l'information olfactive au sein du BO. Ces processus sont sous le contrôle de nombreux facteurs de croissance (Newman *et al.*, 2000; Hansel *et al.*, 2001b). **Figure 10b.**

Figure 10a. *Photographie de cerveau de rat (face dorsale) et zoom sur les bulbes olfactifs.*

Crédit : Shinohara et al., 2011

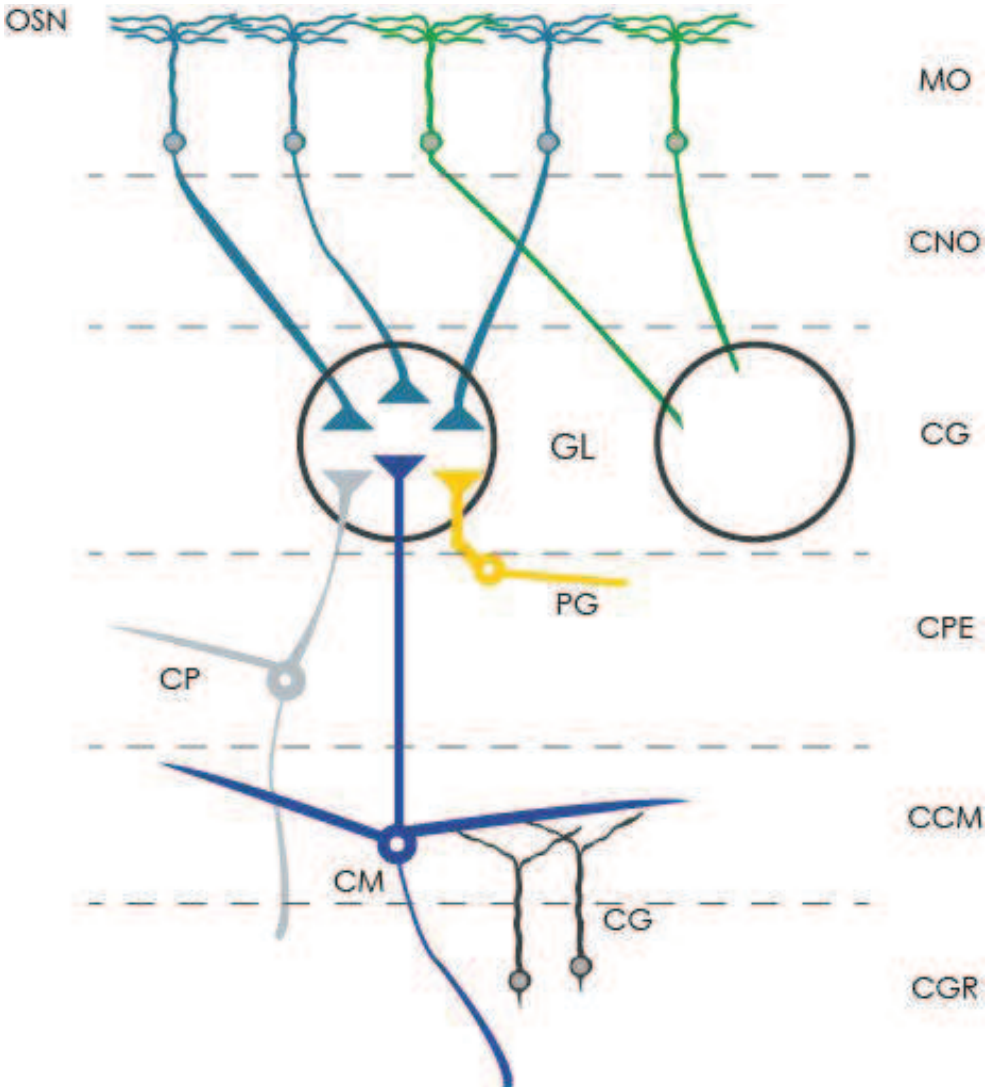


Figure 10b. *Schéma de l'organisation du bulbe olfactif.*

Au niveau de la muqueuse olfactive (MO), les neurones olfactifs (OSN) isorecepteurs projettent leurs axones à travers la lame criblée pour atteindre le bulbe olfactif. Cela forme la couche des nerfs olfactifs (CNO). Ces axones se rassemblent au niveau d'un même glomérule (GL). Les glomérules forment à leur tour la couche glomérulaire (CG). Au sein d'un glomérule les OSN font synapse avec les cellules à panache (CP) et les cellules mitrales (CM). Les cellules périglomérulaires (PG) sont connectées à plusieurs glomérules. La couche plexiforme externe (CPE) contient le corps cellulaire des cellules à panache. Bien individualisés, les corps cellulaires des cellules mitrales forment la couche des cellules mitrales (CCM) facilement reconnaissable. La couche granulaire (CGR) est la plus profonde et contient les cellules granulaires (CG) qui font des synapses entre les dendrites des cellules mitrales.

Crédit : LNAcody modifiée à partir de Mori et al., 1999

B. L'endothéline-1

1. Découverte et voie de synthèse

C'est en 1988 que l'endothéline 1 (ET-1) fut découverte par Yanagisawa et al. L'ET-1 est composé de 21 acides aminés structuré par des ponts disulfures intramoléculaires. La première fonction révélée de l'ET-1 fut un rôle de vasoconstriction (Yanagisawa *et al.*, 1988). La famille des endothélines se constitue de 3 membres, ET-1, ET-2 et ET-3. Codés par 3 gènes distincts, les 3 peptides ainsi formés possèdent le même nombre d'acides aminés (Inoue *et al.*, 1989). Chez les mammifères, une série de clivage enzymatique mature un précurseur de plus de 200 acides aminés (Itoh *et al.*, 1988) et aboutit à la formation d'un intermédiaire essentiel : la big-endothéline 1 (bigET-1) (Fabbrini *et al.*, 1993). Composée d'une quarantaine d'acides aminés, elle nécessite une dernière étape enzymatique pour former la molécule biologiquement active : ET-1. Ce clivage protéolytique est assuré par l'ECE-1 (Endothelin Converting Enzyme) (Fabbrini *et al.*, 1993). **Figure 11.**

Au sein de l'organisme, ET-1 est exprimée dans de nombreux tissus. La production est principalement assurée par les cellules endothéliales (Masaki, 2004). Au niveau du système nerveux central, l'ET-1 est synthétisée dans divers aires cérébrales par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins cérébraux (Naidoo *et al.*, 2004). Toutefois de nombreuses cellules sont capables d'en assurer la sécrétion comme les neurones (Giaid *et al.*, 1989), ou encore les cellules gliales (MacCumber *et al.*, 1989) et plus précisément les astrocytes (Ehrenreich *et al.*, 1991).

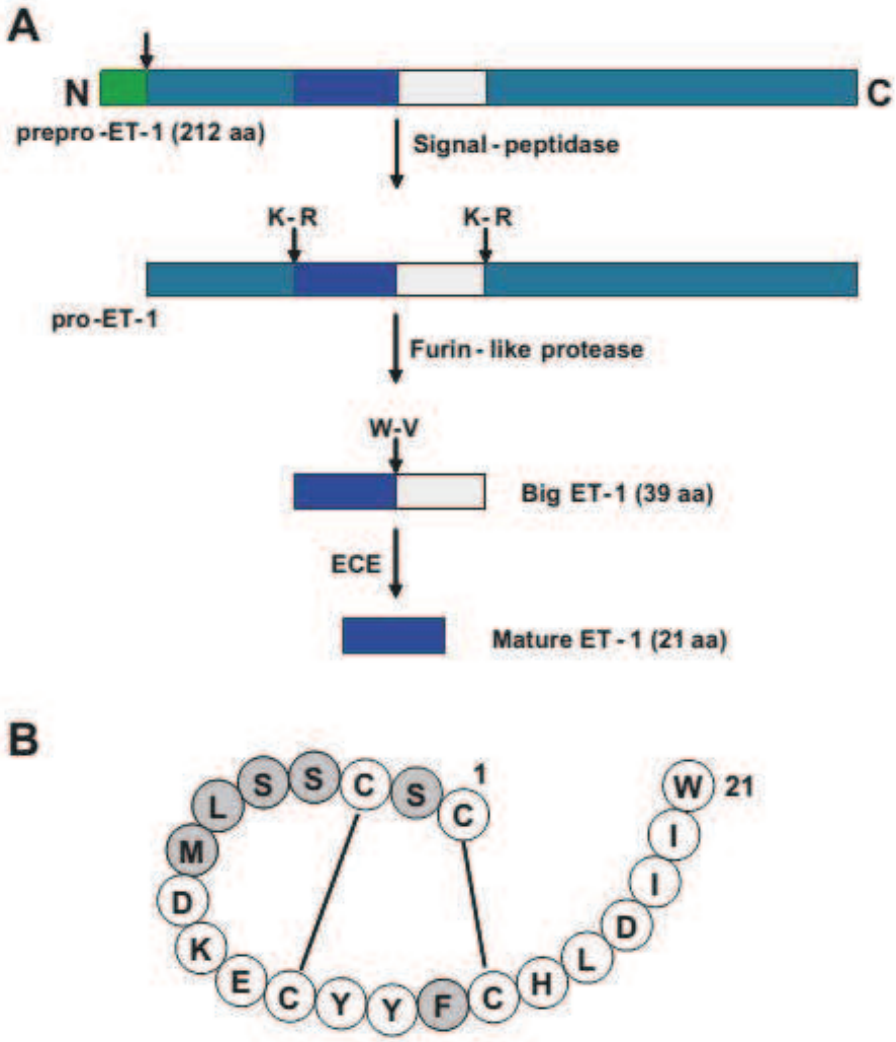


Figure 11. *Biosynthèse et structure de l'endothéline.*

A L'endothéline biologiquement active est issue du clivage enzymatique de pro-peptide, Big-endothélines. Une fois produite, l'endothéline est sécrétée d'une manière inductible ou constitutive. ECE : Endothelin Converting Enzyme. **B** Structure des 21 acides aminés qui constituent l'endothéline active.

Crédit : Fangan et al., 2001

2. Fonctions de l'endothéline-1

a. Un peptide pléiotrope

ET-1 est un peptide aux nombreuses fonctions biologiques agissant de façon autocrine et paracrine (Shichiri *et al.*, 1991; Schinelli, 2006). Son action majeure est vasoactive (Wright & Fozard, 1988; Yanagisawa *et al.*, 1988). Cependant, son rôle ne se limite pas à ce seul aspect et de nombreuses actions cellulaires ont été décrites pour ce composé. **Figure 12.**

Parmi ces différents rôles plusieurs concernent plus ou moins directement le système nerveux et les communications cellulaires.

b. Modulation de la dynamique cellulaire

L'ET-1 est impliqué dans la dynamique cellulaire et les observations faites sur les effets de ce peptide sont variables et dépendant du contexte patho- ou physiologique de l'étude. En effet, l'ET-1 est impliqué dans différents mécanismes tels que la migration et l'invasion cellulaire dans un contexte de mélanome (Bagnato *et al.*, 2004; Mangahas *et al.*, 2005). Elle participe d'un coté à la prolifération cellulaire des fibroblastes du poumons ou d'astrocytes en culture (Gadea *et al.*, 2008) et à la survie cellulaire dans les carcinomes de rein ou au sein de culture de cellules cancéreuses (Shichiri *et al.*, 1991; Pflug *et al.*, 2007), et d'un autre coté à l'apoptose toujours dans ce contexte de mélanome humain (Okazawa *et al.*, 1998).

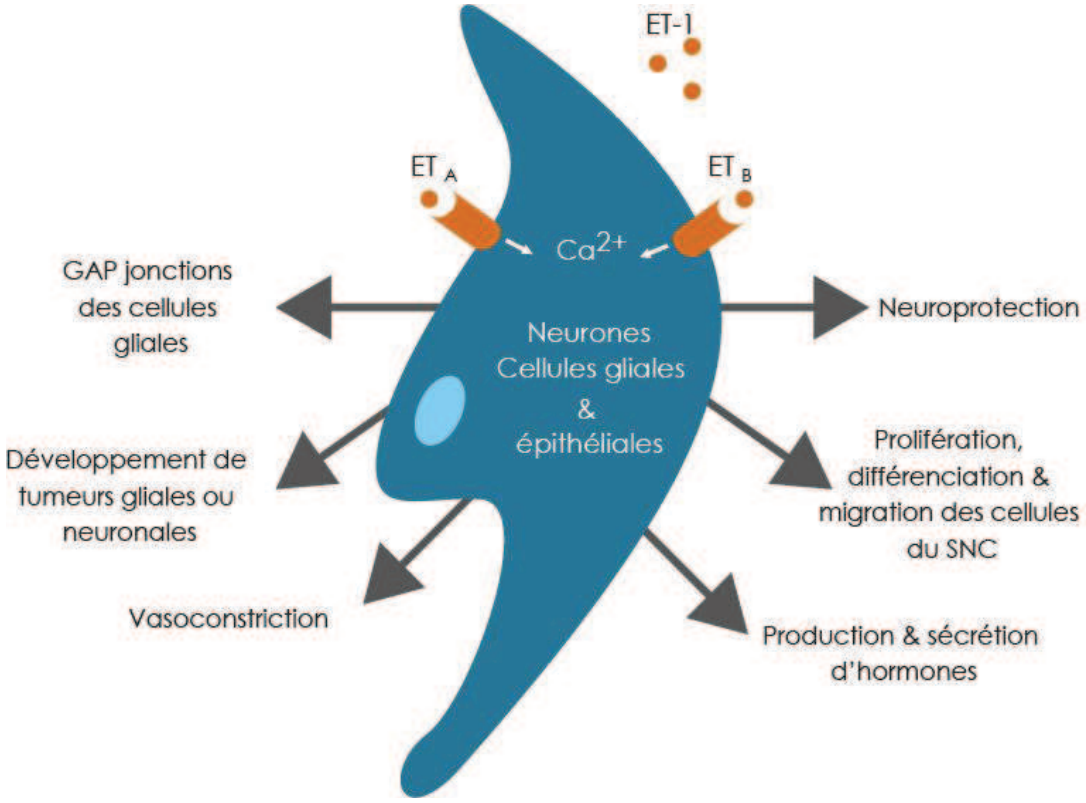


Figure 12. *Rôles physiologiques principaux du système endothéline.*

Les endothélines et leurs récepteurs ont un rôle physiologique dans de nombreux organes.

Crédit : LNAcody

c. Action sur les jonctions communicantes

Alors que l'ET-1 induit des réponses calciques capables de se propager à travers les jonctions communicantes d'ovocytes folliculaires de *Xenopus laevis* (Kumar *et al.*, 1993), de nombreuses données indiquent que ce peptide module l'état d'ouverture des jonctions GAP. Ainsi, dans le système cardiaque, le système endothéline semble augmenter la conductance à travers les jonctions GAP de cardiomyocytes en culture (Polontchouk *et al.*, 2002). Une action similaire a été décrite dans une culture cellulaire de muscles lisses provenant du système cérébrovasculaire de lapin (Wang *et al.*, 2009). L'ET-1 peut également modifier l'expression de connexines 43 et ainsi bouleverser la communication passant à travers les jonctions GAP (Herve & Dhein, 2006).

d. Action sur la communication nerveuse centrale

Dans le système nerveux central, ET-1 influence directement l'excitabilité des réseaux neuronaux. *In vitro* et *in vivo*, il module la libération de divers neurotransmetteurs (Yoshizawa *et al.*, 1989; Webber *et al.*, 1998; Hoang *et al.*, 2002). L'ET-1 semble avoir un rôle dans diverses pathologies cérébrales, comme les migraines, la formation de tumeurs ou encore la maladie d'Alzheimer (Minami *et al.*, 1995; Egidy *et al.*, 2000).D'autre part, ET-1 agit directement sur les cellules gliales (Ostrow & Sachs, 2005). Ces actions impliquent plusieurs voies de transduction dans le tissu nerveux (Rubanyi & Polokoff, 1994; Kuwaki *et al.*, 1997). Les endothélines ont une relation importante avec les astrocytes, cibles privilégiées d'ET-1 dans le cerveau. En effet, ET-1 régule la prolifération et l'activation des astrocytes. Cette activation astrocytaire par l'ET-1 passe par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire (Giaume *et al.*, 1992; Filosa *et al.*, 2012). Plusieurs études ont démontré que les jonctions GAP sont impliqués dans la propagation des ondes calciques astrocytaires (Venance *et al.*, 1998). Ce n'est donc pas étonnant de voir que l'ET-1 inhibe également les communications cellulaires entre astrocytes en modulant directement les

jonctions GAP. Cela fut montré d'abord montré *in vitro* en (Giaume *et al.*, 1992) puis *in vivo* sur tranches d'hippocampe (Blomstrand *et al.*, 2004). Des traitements à l'ET-1 réduisent l'expression protéique dans les astrocytes (Hasselblatt *et al.*, 2003) et donc des connexines (Tence *et al.*, 2012). En présence d'ET-1, des changements morphologiques sont observables sur des astrocytes comme sur des OECs (Vincent *et al.*, 2003). Ces changements morphologiques impliquent chez les astrocytes un découplage du réseau de jonctions GAP.

Une équipe s'intéresse depuis quelques années aux effets de l'ET-1 dans le bulbe olfactif. Ils ont alors montré que l'ET-1 a des effets à court et long termes au niveau de cette région cérébrale en agissant sur différentes fonctions cellulaires (activité de la tyrosine hydroxylase par exemple). Par ailleurs ils ont mis en évidence l'implication de flux calciques dans ces mécanismes. Mais aucun effet sur les jonctions GAP des astrocytes du bulbe olfactif n'a encore été relevé. (Nabhen *et al.*, 2009; Nabhen *et al.*, 2013).

e. Modulation de la communication dans le système nerveux périphérique

Au niveau périphérique, l'ET-1 induit des changements dans la physiologie des péricytes rétiniens. L'ET- 1 diminue la conductance de péricytes en diminuant la communication à travers les jonctions GAP de manière PKC dépendante (Kawamura et al., 2002). Cette étude souligne de plus que l'ET-1 induit un phénomène de contraction du tissu lié à une rétractation cellulaire.

L'ET-1 participe également à la nociception, en particulier la douleur d'origine inflammatoire et neuropathique. Plusieurs études illustrent clairement la relation entre ET-1 et l'inflammation (Ehrenreich *et al.*, 1990; Pittman, 2006). L'endothéline a été décrite comme un modulateur endogène puissant de la muqueuse olfactive en induisant de fortes réponses calciques des cellules gliales présentes dans ce tissu (Gouadon *et al.*, 2010). De plus, l'ET- 1 agit comme un facteur anti-apoptotique sur les cellules de la

muqueuse olfactive aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Laziz *et al.*, 2011; Francois *et al.*, 2013).

Cependant les fonctions et les mécanismes du système endothéline dans la muqueuse olfactive restent à élucider. Les signaux calciques engendrés ont-ils une importance sur les jonctions GAP des cellules de la muqueuse olfactive ? Ces phénomènes participent ils à la fonction olfactive ?

3. Les récepteurs ET_A et ET_B aux endothélines

a. Les deux types et leur expression

Il existe chez l'homme deux types de récepteurs aux endothélines, ET_A et ET_B, codés par des gènes différents (Sakurai *et al.*, 1992). Ces récepteurs sont couplés aux protéines G et possèdent donc sept domaines transmembranaires. Ils présentent des affinités différentes vis-à-vis des endothélines. ET_B n'a pas de spécificité vis-à-vis des trois peptides alors que ET_A a une plus grande affinité pour ET-1 et ET-2 (Sakurai *et al.*, 1990). Bien que tous deux exprimés dans le système nerveux central par les cellules endothéliales ou les cellules gliales (Wilkins *et al.*, 1997; Zidovetzki *et al.*, 1999; Schinelli *et al.*, 2001) ET_A semblent être exprimé préférentiellement par les cellules endothéliales au niveaux des vaisseaux cérébraux (Wilkins *et al.*, 1997; van den Buuse & Webber, 2000). Concernant l'expression de ET_C, celle-ci a uniquement été décrite chez les amphibiens (Karne *et al.*, 1993; Kumar *et al.*, 1994).

b. Voie de transduction

La stimulation des récepteurs par l'endothéline conduit à de multiples voies de transduction. La principale décrite pour les deux récepteurs passe par l'activation d'une protéine G_q qui active à son tour la PLC (Venance *et al.*, 1997) ce qui entraine une augmentation du calcium intracellulaire et une activation de la PKC. Les voies de transduction associées aux récepteurs à

l'endothéline semblent se différencier leur spécificité et leur intensité d'activation. Enfin des dimères ET_A et ET_B peuvent également être exprimés à la membrane plasmique (Raymond *et al.*, 2009; Mazzuca & Khalil, 2012).

Cependant, d'autres voies peuvent être activées à travers les récepteurs à l'endothéline. Ainsi selon le type cellulaire, l'activation des récepteurs ET_A peut conduire à une dégradation de l'AMPc par action sur une protéine G_i, ou encore à une activation des différentes voies de signalisation dépendantes des MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Rubanyi & Polokoff, 1994). **Figure 13.**

Enfin, les récepteurs de l'ET-1 sont connus pour être facilement désensibilisés, sur des types cellulaires très différents comme des cellules cancéreuse humaines en culture (Rubanyi & Polokoff, 1994; Freedman *et al.*, 1997) ou encore des cellules de MO en culture comme cela a été constaté au sein du laboratoire (Gouadon *et al.*, 2010).

c. Spécificité des récepteurs vis-à-vis de l'action des endothélines sur les astrocytes

Les deux récepteurs semblent être impliqués dans les effets vasoactifs de l'ET-1, qui agit de façon paracrine pour globalement induire la contraction des muscles lisses. Cependant, alors que la voie initiée par ET_A favorise la vasoconstriction par augmentation du taux de calcium intracellulaire, l'activation par ET_B entraîne au contraire une vasodilatation en stimulant la production de NO (Nilsson *et al.*, 2008).

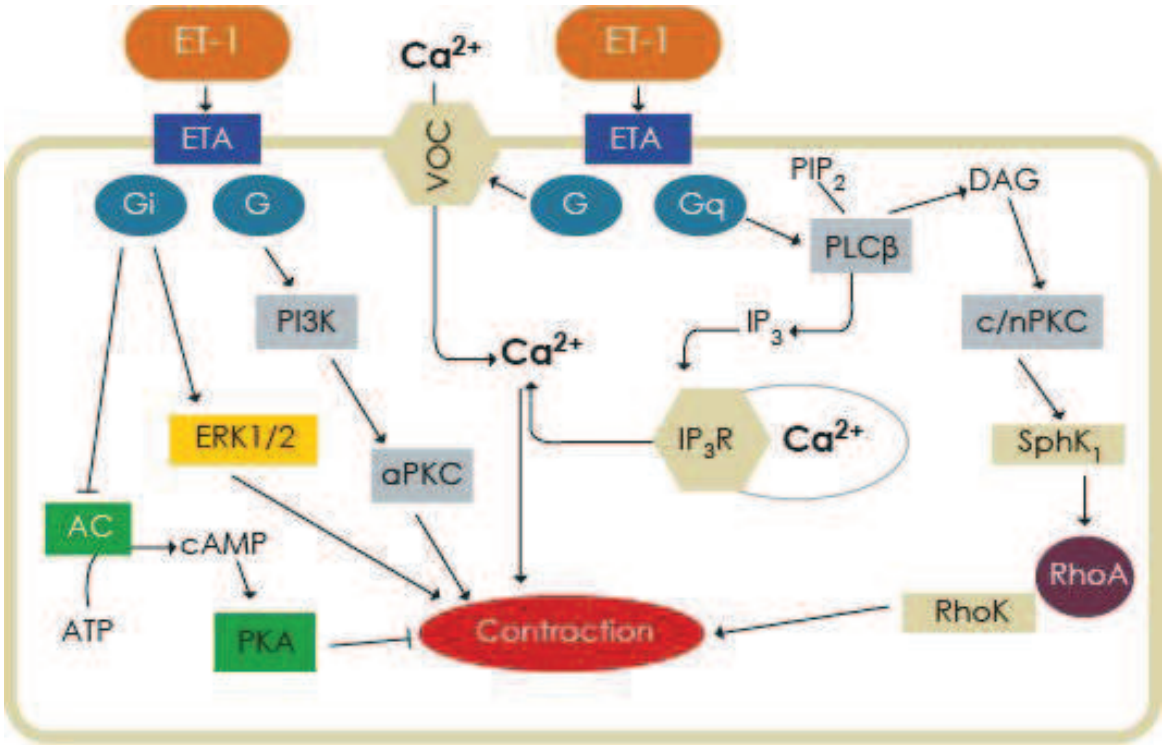


Figure 13. *Voies de signalisation majoritaires déclenchées par les récepteurs à l'endothéline.*

AC: Adénylate Cyclase; AMPc: Adenosine Monophosphate cyclique; PK: Protéine Kinase; PL: phospholipase; IP3: Inositol triphosphate; PI3K: Phosphatidylinositol 3 kinase ; ERK: Extracellular signal regulated Kinase.

Crédit : LNAcody

De la même façon, les deux récepteurs participent aux actions sur les astrocytes de l'ET-1. Ainsi, la genèse de vagues calciques et le découplage des jonctions GAP induites par l'ET-1 nécessite à la fois ET_A et ET_B (Blomstrand *et al.*, 1999; Blomstrand & Giaume, 2006). Par contre, d'autres voies sont engagées par ces récepteurs en plus de la montée de calcium pour assurer des rôles spécifiques. Par exemple, ET_B est impliqué dans la prolifération et l'hypertrophie des astrocytes ainsi que l'activation de l'expression du BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) dans ces mêmes cellules (Dong *et al.*, 2005; Koyama *et al.*, 2005). ET_B intervient également dans l'inhibition de l'expression d'ECE-1 dans les astrocytes (Hynynen & Khalil, 2006).

ET_A quant à lui est engagé dans la survie, la croissance et la prolifération cellulaire (Shigematsu *et al.*, 1998; Hynynen & Khalil, 2006). Ce récepteur est également associé dans les signaux calciques des astrocytes du nerf optique (Hynynen & Khalil, 2006).

Au sein de la muqueuse olfactive, des études d'expression du laboratoire ont montré que les deux récepteurs ET_A et ET_B sont exprimés (Gouadon *et al.*, 2010).**Figure 14a et 14b.** En culture cellulaire, les effets induits par l'ET-1, à savoir l'activité calcique et l'effet protecteur, sont dus à une activation d'ET_A pour les cellules gliales et d'ET_B pour les neurones olfactifs (Gouadon *et al.*, 2010; Laziz *et al.*, 2011). **Figure 14c.** L'implication de ces récepteurs sur d'autres effets de l'ET-1 au sein de la muqueuse olfactive reste encore à explorer.

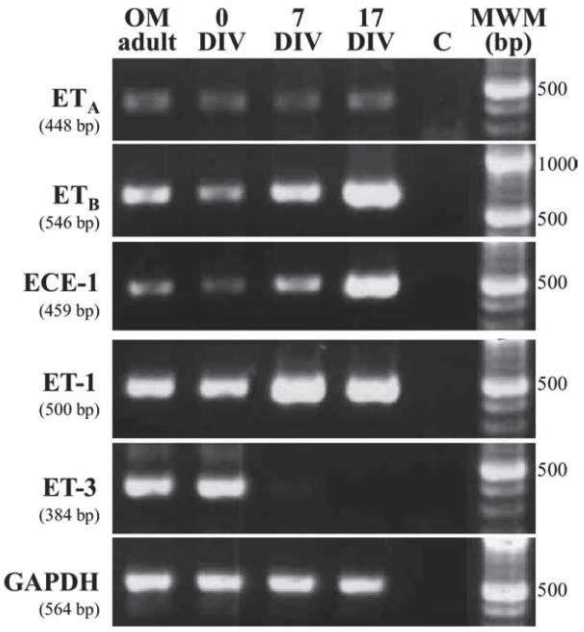


Figure 14a. *Présence du système endothéline dans la MO.*

Produits de PCR pour les différents composants du système endothéline issus de MO de rat adulte et de culture primaire (après 0, 7 et 17 jours de culture). Les ARNm des récepteurs ET_A et ET_B, l'enzyme ECE et l'ET-1 et l'ET-3 ont été mesuré.

Issue de l'article : Gouadon et al. , 2010

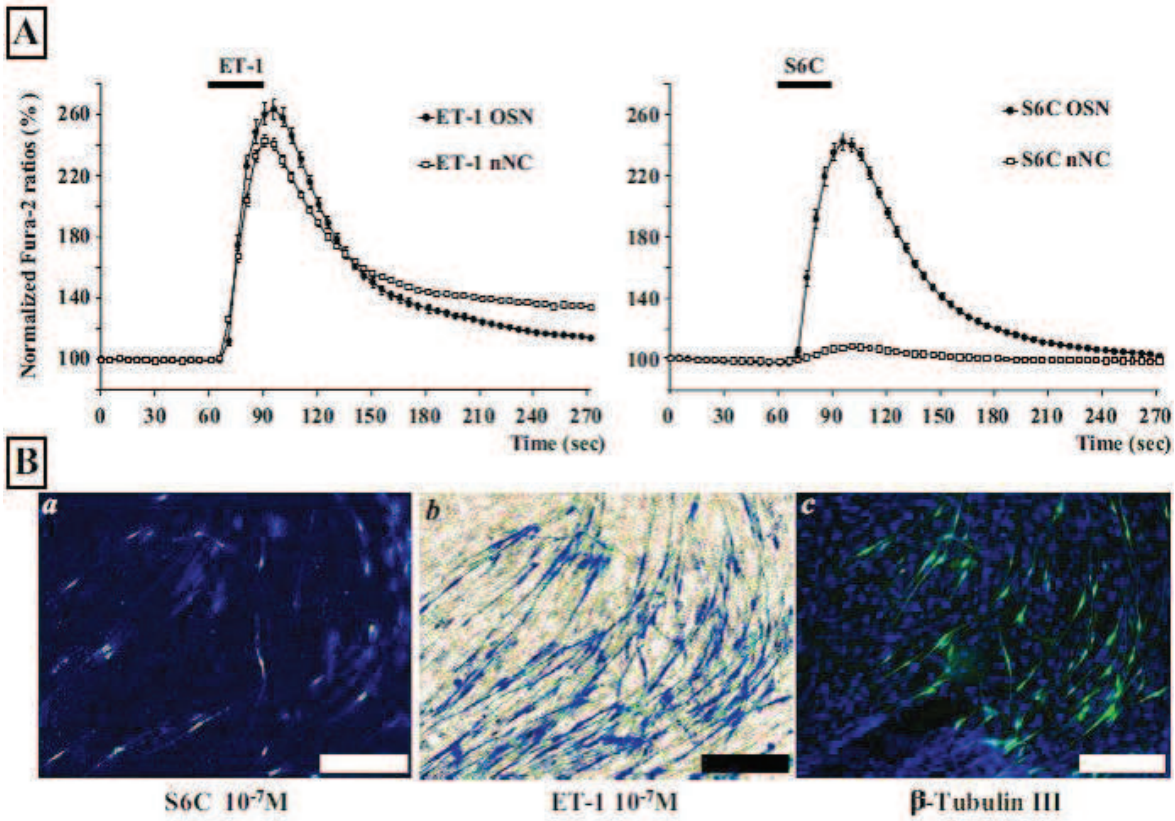


Figure 14b. *L'ET-1 induit de fortes réponses calciques des cellules de la MO en culture primaire.*

A Quantification de la réponse calcique des neurones et des cellules gliales suite à une stimulation à l'ET-1 (10^{-7}M) ou à la S6C (10^{-7}M). La réponse calcique induite par l'ET-1 chez les cellules gliales de la MO passe par les récepteurs ET_A. **B** Images des expériences d'imagerie calcique (avant stimulation à l'ET-1, au pic de stimulation). La dernière photo montre la localisation des neurones par marquage βTubuline III.

Issue de l'article : Gouadon et al., 2010

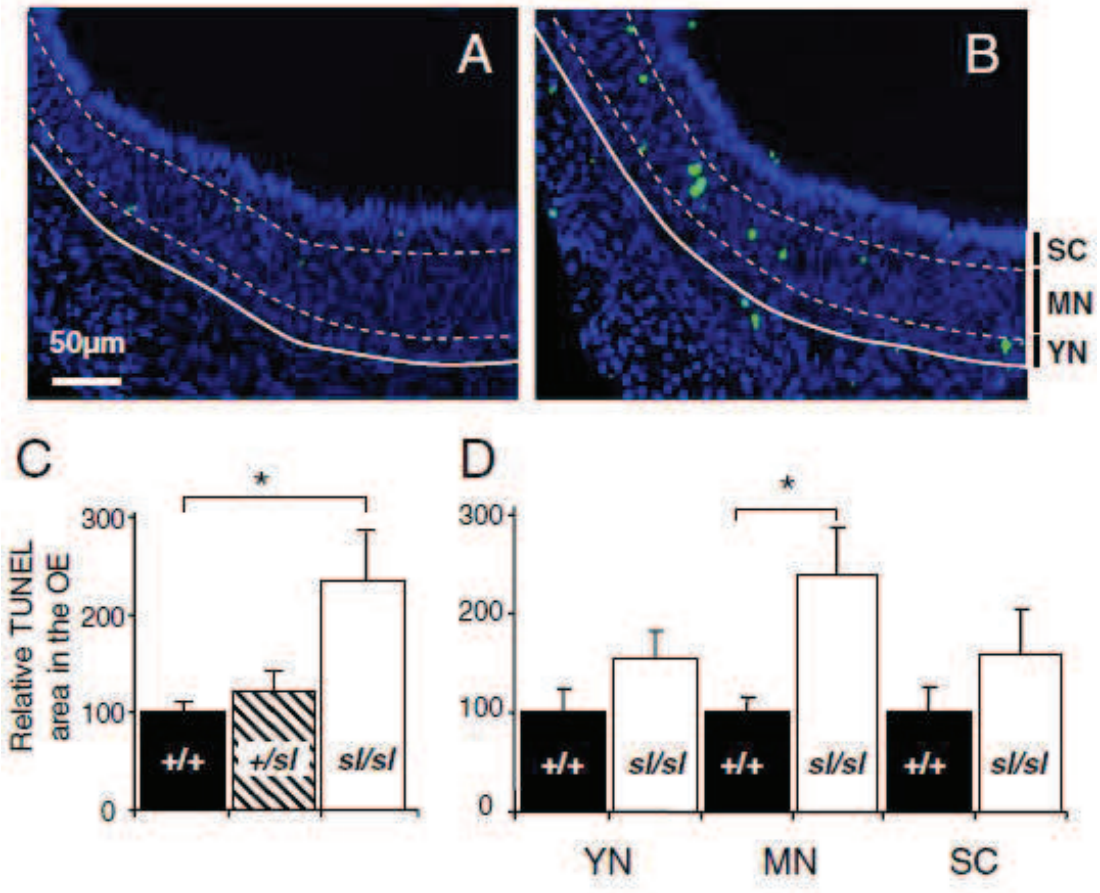


Figure 14c. *L'absence du système endothéline augmente la mort cellulaire.*

Quantification in vivo de la mort cellulaire par la technique TUNEL : en A, coupe de MO de rat contrôle, en B coupe de MO de rat SI/SI, rat déficient pour le récepteurs ETB. Les rats SI/SI présentent une augmentation de l'apoptose au sein de la MO.

Issue de l'article : Laziz et al., 2011

4. Régulation de la voie de l'endothéline-1

Tous les acteurs du système endothéline, des propeptides aux récepteurs en passant par les enzymes, peuvent être la cible de régulation (Kurihara *et al.*, 1989). Ces modulations vont alors stabiliser les concentrations d'ET-1 actives disponibles. Les récepteurs ET_A et ET_B subissent également des régulations régies par de nombreuses voies cellulaires. Par ailleurs, ET-1 exerce directement une régulation négative sur l'expression des récepteurs ET_A et ET_B (Clozel *et al.*, 1993). La libération d'ET-1 est bien évidemment elle aussi contrôlée. Une première voie constitutive, libère une faible concentration d'ET-1. Elle intervient dans la balance de l'activité vasoactive de l'ET-1. Divers stimuli entrainent des libérations régulées plus importantes d'ET-1. L'ET-1 est alors stocké dans les cellules avant d'être libéré (Russell & Davenport, 1999).

C. Les jonctions communicantes

1. Structure des jonctions communicantes

a. De la communication intercellulaire à la jonction GAP

Au sein d'un organisme pluricellulaire, l'homéostasie est assurée par plusieurs niveaux de communication. Les systèmes endocriniens, nerveux, immunitaires véhiculent un grand nombre d'informations entre eux. Ces informations vont engendrer une action intracellulaire en passant entre autre par des seconds messagers, comme l'AMPc ou le calcium. Ces cascades de transduction aboutissent à une réponse cellulaire et une possible communication intercellulaire. Ces différentes communications sont fortement connectées pour permettre le contrôle de fonctions cellulaires comme la prolifération, la différentiation ou encore la mort cellulaire (Trosko & Ruch, 1998).

Les premières études sur la communication intercellulaire datent des années 50 et sont basées des approches de microscopie électronique. Il a été ainsi montré par cryofracture chez les vertébrés, que ces communications

utilisent des canaux transmembranaires reliant directement, de cytoplasme à cytoplasme, deux cellules adjacentes (Sjostrand & Andersson, 1954). Ce couplage anatomique a été confirmé en mettant en évidence l'existence de couplage électrique direct entre cellule (Furshpan & Potter, 1959).

La structure des jonctions communicantes est désormais bien établie. Ces jonctions sont formées de sous-unités protéiques de structure pentalaminaire caractéristiques des jonctions GAP. Elles peuvent se regrouper et forment ainsi des plaques jonctionnelles. Des milliers de jonctions GAP se retrouvent ainsi localisées (Lauf *et al.*, 2002). La communication intercellulaire lie, connecte et coordonne les cellules adhérentes.

b. De la jonction GAP aux connexines

Plusieurs études ont montré que chaque cellule contribue à la formation d'une jonction communicante par l'association d'un demi-canal ou connexon avec son homologue de la cellule voisine (Caspar *et al.*, 1977; Makowski *et al.*, 1977). Des interactions hydrophobes permettent de maintenir la liaison entre les connexons (Musil & Goodenough, 1991). Chaque connexon se constitue de 6 sous-unités protéiques transmembranaires appelées connexines, formant une structure annulaire. **Figure 15.**

c. Connexines : sous-unités protéiques

Les gènes codant pour les connexines forment une famille multigénique (une vingtaine de gènes sont impliqués) (Sohl & Willecke, 2003). Les connexines sont synthétisées en continu et dégradées par internalisation. Bien qu'une controverse subsiste sur la localisation de l'assemblage des jonctions GAP, il est nécessaire que ces canaux s'associent pour être fonctionnels (Segretain & Falk, 2004). Les connexons peuvent diffuser librement dans la membrane plasmique (Laird, 2006) et le contact entre deux cellules initie rapidement la formation de jonctions GAP (Meda, 1996b).

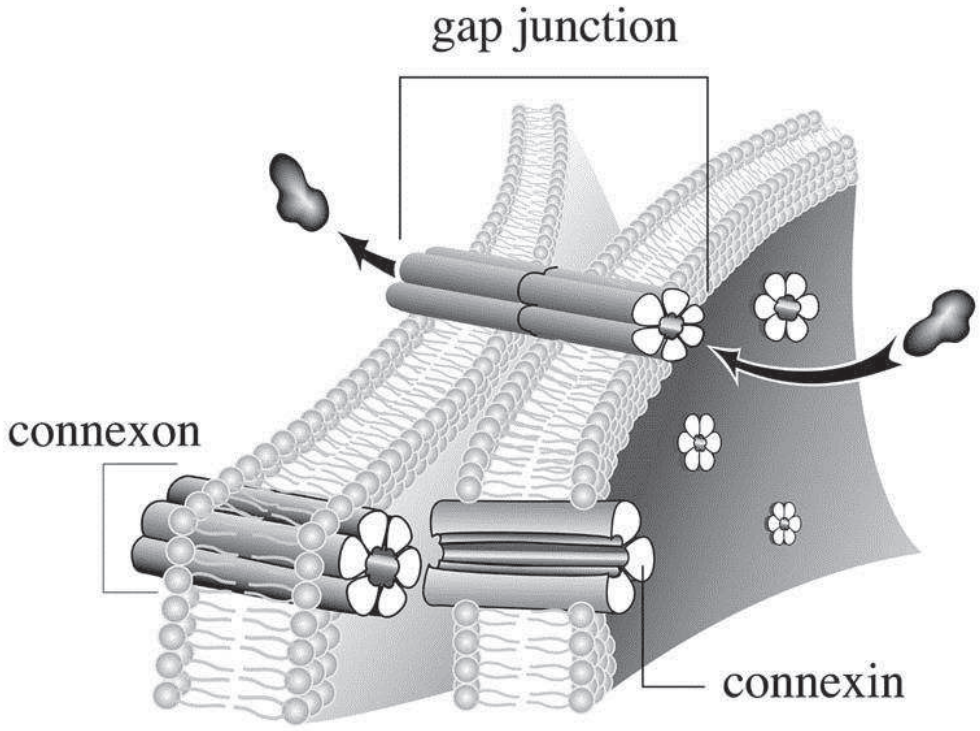


Figure 15. *Structure des jonctions GAP.*

Les connexines sont les unités structurales des jonctions GAP. Exprimées à la membrane cellulaire, 6 connexines forment un hémi canal appelé connexon. Deux cellules voisines mettant en commun leur connexon forment ainsi une jonction GAP, un canal permettant le passage d'ions, de second messager ou de métabolite.

Crédit : https://project.inria.fr/keops/what-are-gap-junctions/

Les connexines sont la cible de nombreuses régulations. Elles possèdent de nombreux sites de phosphorylations et l'extrémité C-terminale des connexines constitue une région importante dans la modulation de la fonctionnalité des jonctions GAP (Lampe & Lau, 2004). Cela peut alors influer sur l'ouverture et la fermeture des jonctions GAP. De plus, ces mécanismes de régulations peuvent être reliés à des variations de pH intracellulaire ou alors à événements calcique. Une très forte augmentation de la concentration intracellulaire de calcium pouvant apparaitre lors de traumatisme cellulaire important déclenche la fermeture des jonctions GAP, ce qui limite la propagation de vague de mort cellulaire notamment (Wei *et al.*, 2004).

2. Propriétés physiologiques des jonctions communicantes

a. Couplage électrique

Démontré dans les systèmes nerveux et cardiovasculaire, les jonctions GAP permettent une communication électrique entre les cellules. Dès les années 50, ce couplage a été détecté entre des cellules cardiaques (Weidmann, 1952). Il aura néanmoins fallu une dizaine d'années pour que la relation entre le couplage électrique et la présence des jonctions communicantes soit clairement établie (Robertson *et al.*, 1963). Le couplage électrique, mis en évidence dans un premier temps dans des tissus excitables, fût ensuite démontré dans d'autres tissus (Penn, 1966). Le couplage électrique par échange d'ions est indispensable à certains types cellulaires dont les fonctions sont associées à une dépolarisation (certaines populations neuronales, cellules musculaires lisses, cellules sécrétrices et sensorielles) (Meda, 1996b). Cette forme de couplage permet la formation d'une réponse cellulaire synchronisée (Bruzzone *et al.*, 1996). Le couplage électrique peut être évalué en mesurant la conductance des jonctions GAP par la technique de patch clamp, comme il a été fait au sein de la muqueuse olfactive, entre les SCs (Vogalis *et al.*, 2005a).

b. Couplage métabolique

Différentes approches ont montré que les jonctions communicantes sont perméables à des nucléotides, des acides aminés, des cofacteurs vitaminiques, de petits peptides, des sucres et des seconds messagers (AMPc, inositol triphosphate (IP3)) (Meda, 1996a). Cette propriété met en avant l'importance des jonctions communicantes pour certaines fonctions biologiques, notamment d'ordre métabolique.

c. Perméabilité sélective des jonctions GAP

Le passage des ions et des molécules se fait le long d'un gradient électrochimique. Alors que les jonctions GAP sont perméables à la plupart des ions et à de très nombreuses molécules, la diversité de leur fonction est attribuée à la diversité des connexines synthétisées dans une cellule. Les spécificités d'appariement des connexines et de perméabilité qui en résultent, suggèrent des échanges sélectifs dans une direction préférentielle ou distincte selon les seconds messagers (Meda, 1996a). Toutes les molécules de poids supérieurs à 1kDa ne diffuseront pas par les jonctions communicantes quel que soit le type de connexines dont est composée la jonction communicante. Des traceurs fluorescents de différents poids moléculaires et porteurs de diverses charges tels que le Lucifer Yellow (Kater & Galvin, 1978), l'iodure de propidium (Elfgang *et al.*, 1995) ou la neurobiotine ont été testés pour évaluer la sélectivité et la perméabilité des jonctions GAP composées de différentes connexines *in vitro* et *in vivo* (De Maio *et al.*, 2002). Les molécules peuvent être incorporées différemment en fonction des connexines composant le canal entraînant une grande variété de sélectivité moléculaire transjonctionelle (Laird, 2006). Les études de sélectivité et de perméabilité portant sur des molécules cytoplasmiques ont montré dans les cas où les molécules ont été testées directement, des variations importantes de perméabilité de connexines spécifiques concernant particulièrement les molécules qui médient la signalisation intracellulaire telles que l'AMPc ou l'IP3 (Bevans *et al.*, 1998). La perméabilité des jonctions GAP est aussi fonction

d'autres paramètres tels que le nombre de plaques jonctionnelles au niveau de la membrane de la cellule considérée (Nitsche *et al.*, 2004) et de la probabilité d'ouverture d'une jonction GAP (Goldberg *et al.*, 2004).

d. Fonctions physiologiques

La distribution des connexines quasi-ubiquitaire à toutes les cellules montre la nécessité de ces jonctions GAP pour la survie cellulaire ainsi que leur participation à de multiples fonctions. Certaines connexines sont exprimées par un très grand nombre de types cellulaires comme la Cx43 alors que d'autres ont une distribution beaucoup plus restreinte telle que la Cx30 dont l'expression est limitée aux astrocytes (Pannasch *et al.*, 2014). Il est connu depuis les années 90, que ces canaux intercellulaires participent à la régulation de divers processus tels que :

- La contraction des muscles cardiaques et lisses (Risek *et al.*, 1990)

- Le contrôle de la croissance cellulaire (Loewenstein & Rose, 1992) où ils sont encore considérés comme des acteurs principaux.

Plus récemment, des études ont également montré l'implication des jonctions communicantes dans la compartimentation cellulaire lors du développement embryonnaire (Wei *et al.*, 2004; Esser *et al.*, 2006). Des études actuelles basées sur l'utilisation de souris transgéniques ont clairement mis en évidence le rôle indispensable des connexines dans le développement et la fonctionnalité des tissus et organes (Willecke *et al.*, 2002 ; Dagli & Hernandez-Blazquez, 2007; Pannasch *et al.*, 2014).

La fonction des jonctions GAP qui semble la plus intéressante dans le cadre de cette thèse est l'implication des jonctions GAP dans la transmission des signaux neuronaux aux synapses électriques (Furshpan & Potter, 1957; Bennett, 1997; Pannasch & Rouach, 2013). Les jonctions GAP permettent le couplage électrique entre les neurones et pourraient réguler et/ou synchroniser le réseau d'activité neuronal. Les relations entre réseaux

neuronaux et réseaux des cellules gliales au sein de la MO sont-ils impliqués dans la fonctionnalité olfactive et à quelle échelle ?

D. Données préliminaires

Au début de ma thèse, j'ai pu rebondir sur un certain nombre de données non publiées concernant l'endothéline dans la muqueuse olfactive.

1. Présence du système endothéline *in vivo*

Avant mon arrivée au laboratoire, les approches immunohistochimiques visant à démontrer la localisation de composants du système endothéline au sein de la muqueuse olfactive avaient été infructueuses. En effet, les anticorps utilisés en culture primaire (Gouadon *et al.*, 2010), n'avaient qu'une faible spécificité sur tissu. Puisque les résultats de PCR montraient que le système était bien présent (Gouadon *et al.*, 2010), des hybridations *in situ* ont été réalisées afin de contourner ce problème. Il est assez facile de corréler la localisation de l'expression d'un gène révélée par HIS avec les cellules qui l'expriment car l'épithélium olfactif est organisé de manière très stéréotypée (Moon *et al.*, 2009). En effet, des études sur l'expression de la protéine GAP-43 (growth-associated protein 43 -associée aux neurones immatures) et OMP (Olfactory Marker Protein -associée aux neurones matures (Verhaagen *et al.*, 1989)), ainsi que des approches similaires sur deux cytokératines 18 et 14 marquant respectivement les cellules horizontales et les SCs (Satoh & Yoshida, 2000; Ohta & Ichimura, 2001; Asan & Drenckhahn, 2005) permettent de démontrer que les différents types cellulaires de la muqueuse olfactive ont des noyaux organisés par couche. **Figure 16.** Ainsi, les 25% des noyaux basaux sont ceux des cellules basales et des neurones immatures ; les 25% les plus apicaux ceux des SCs et enfin, au milieu se trouve les noyaux des neurones matures qui migrent vers le pôle apical au fur et à mesure de leur vieillissement (Kondo *et al.*, 2010).

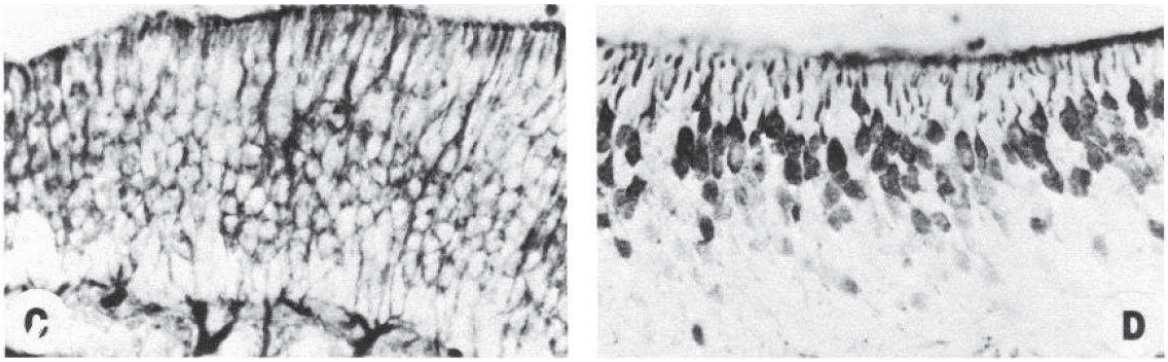


Figure 16. *L'épithélium olfactif est stratifié.*

A Marquage GAP 43 **B** Marquage OMP. Ces 2 marquages mettent en évidence les couches de neurones immatures et matures dans la MO respectivement.

Issue de l'article : Verhaagen et al., 1989

Ainsi en utilisant des sondes spécifiques des précurseur de l'ET-1 (Big ET-1) ; de l'enzyme de conversion, ECE-1 ainsi que des deux récepteurs ET_A et ET_B, il est possible de retrouver les types cellulaires exprimant les différentes composantes de ce système. **Figure 17.** On peut voir sur la **Figure 17-1** que toutes ces composantes sont fortement exprimées dans la couche de cellules neuronales et basales. Ce n'est pas le cas au niveau des SCs où les deux récepteurs ainsi que l'enzyme de conversion sont exprimés plus faiblement (Flèches noires **Figure 17-1**). Quant à la Big- ET-1, elle est quasiment absente de cette couche cellulaire (flèches noires; **Figure 17-1B**). De manière remarquable, l'expression du système endothéline n'est pas limitée à l'épithélium olfactif. En effet, on retrouve un marquage de tous les composants de ce système dans la lamina propria. Ce marquage est concentré au niveau de cellules entourant les faisceaux d'axones (pointes de flèche rouge; **Figure 17-1A, 1D, 1G, 1J**), qui pourraient tout à fait correspondre aux cellules engainantes (Nakajima *et al.*, 2013). Toutes ces données sont cohérentes avec ce qui avait été publiés à partir d'études sur la culture primaire et interrogent sur le rôle de l'endothéline dans ce tissu.

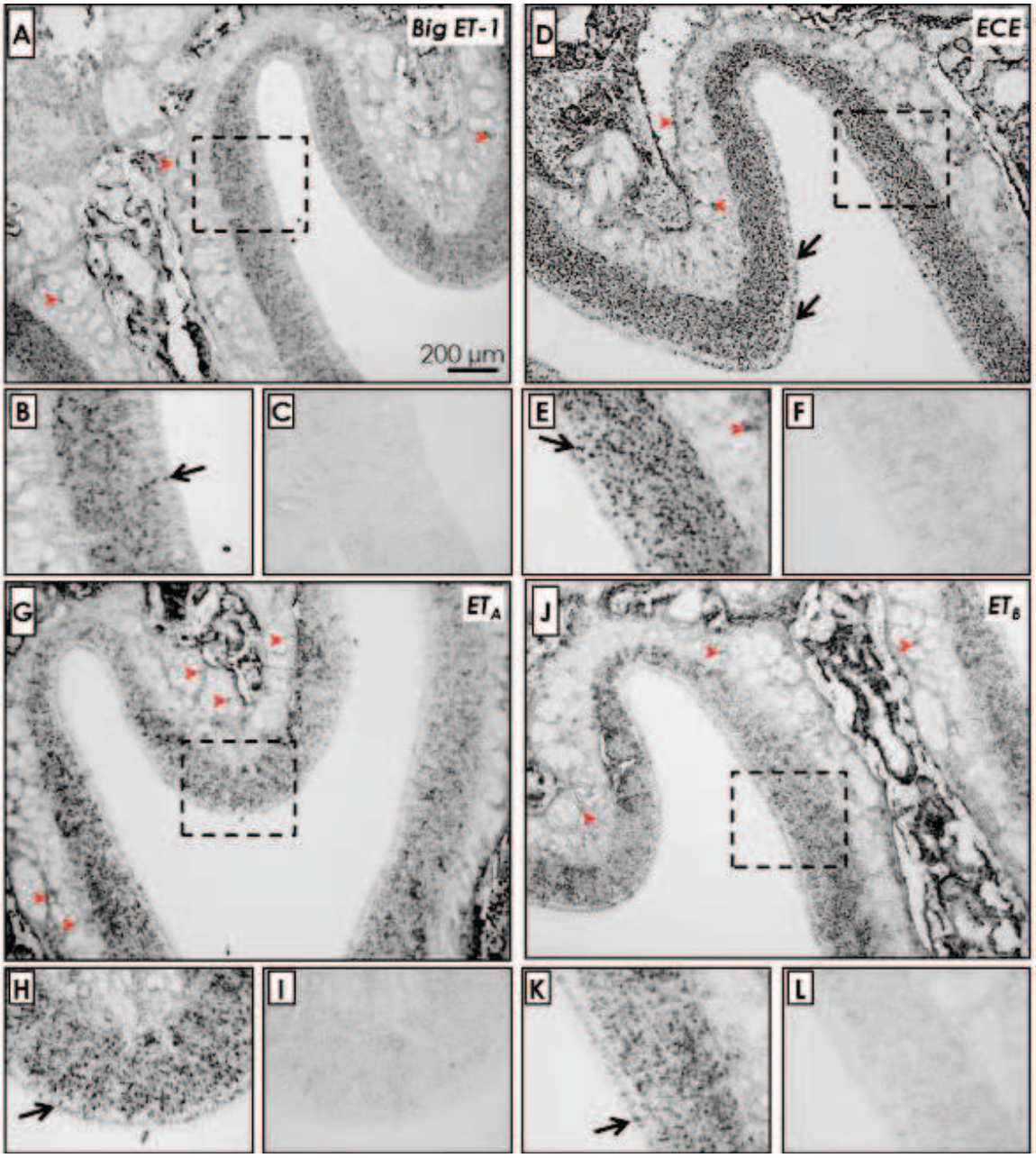


Figure 17. *Expression du système endothéline dans la MO révélée par Hybridation In situ.*

Big-ET (**A**), ECE (**D**) ET_A (**G**) et ET_B (**J**) ont le même profil d'expression : fortement exprimé dans la couche des OSNs et plus faiblement dans les régions des OECs (flèches rouges) et des SCs (flèches noires). Les encarts (**B**)(**E**)(**H**)(**K**) et les contrôles négatifs (**C**)(**F**)(**I**)(**L**) correspondent respectivement aux zones pointillées au sein des photos principales.

Issue de l'article : Le Bourhis et al., 2014.

2. Mise en évidence d'un rôle potentiel d'agent découplant de l'endothéline en culture primaire

Comme l'endothéline est connu pour moduler l'état d'ouverture des jonctions GAP (Giaume *et al.*, 1992; Blomstrand *et al.*, 1999; Blomstrand *et al.*, 2004); des études préliminaires avaient été réalisées afin d'étudier l'impact de l'endothéline sur la propagation d'une vague calcique à travers les cellules de la culture. Cette vague calcique était initiée à l'aide de stimulations électriques effectuées par une électrode sur le tapis cellulaire de la culture primaire. Deux stimulations successives était réalisées sur un même champ d'observation d'une lamelle de cette culture (Zone 1 ; **Figure 18. A**). Afin d'évaluer la propagation de cette stimulation qui provoquait une montée du calcium dans la cellule activée, l'intensité de signal calcique était évaluée au sein d'un anneau situé à distance du centre de stimulation **Figure 18 B**.

En condition contrôle, la perte de signal était modeste (de l'ordre de 10%) mais dépendait de la distance entre l'électrode et la zone stimulée et surtout de la qualité de la lamelle. En effet, la qualité de la culture primaire était non seulement variable d'une série à une autre mais même au sein d'une même série entre lamelle. Pour pallier à cette difficulté et ainsi limiter l'impact de cette variation inhérente à la culture primaire, une deuxième série de stimulations était réalisée dans une autre zone (Zone 2) et la perte de signal entre les deux stimulations successives était comparée entre les deux zones. Si la lamelle avait été perfusée avec une solution saline ou de l'ATP, la perte de signal entre les deux stimulations successives était comparable dans les deux zones et ainsi le ratio des deux stimulations successives était proche de 100%. Par contre, en présence d'agent découplant des jonctions GAP comme la carbenoxolone ou le 18aGA ainsi qu'en présence d'ET-1, cette propagation était limitée (**Figure 18**).

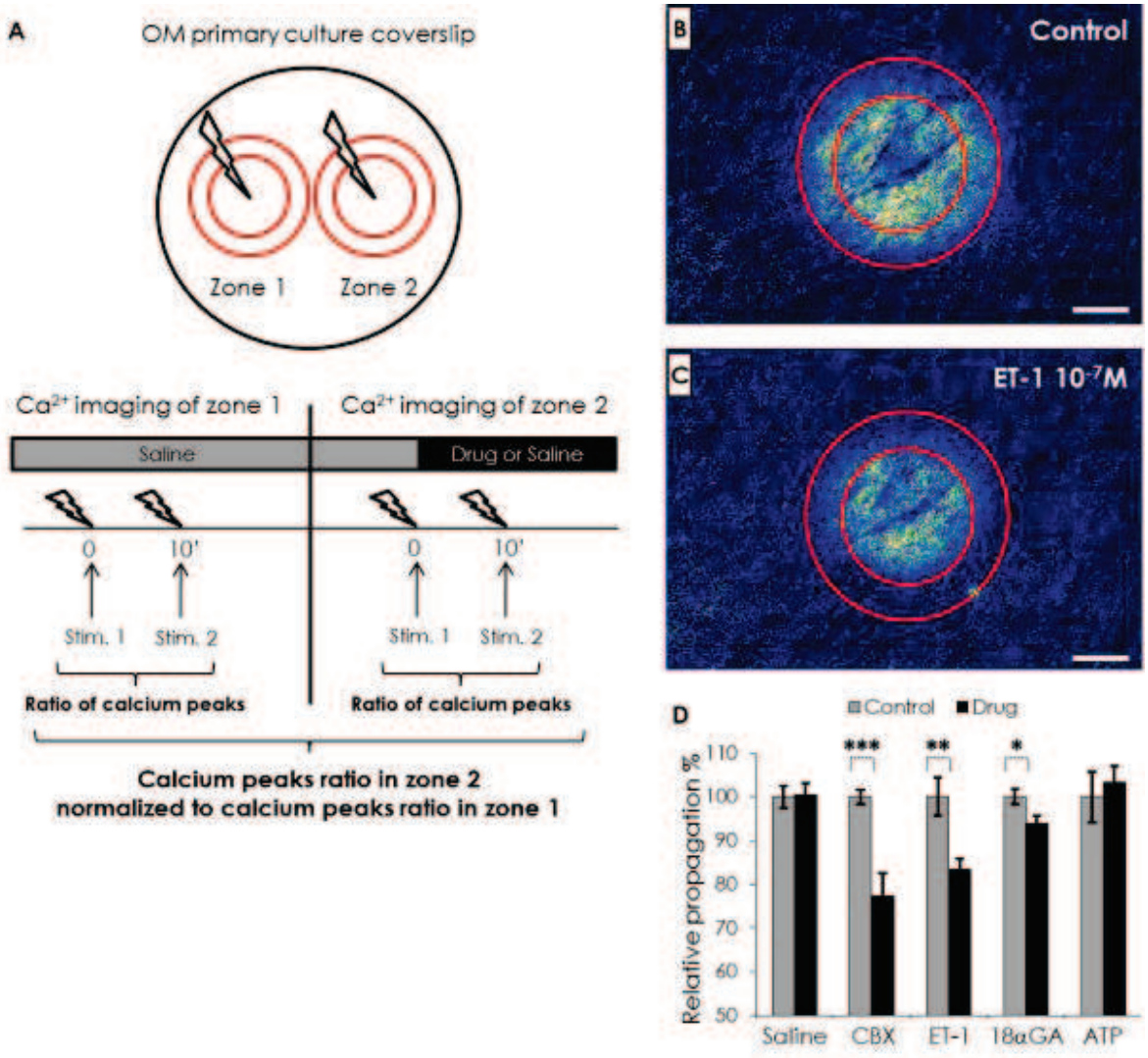


Figure 18. *Inhibition de la propagation calcique par les agents découplants des jonctions GAP.*

A Procédure expérimentale. **B** Photographies montrant la vague calcique générée par un choc électrique en condition contrôle ou en présence d'ET-1 (10^{-7}M). Les cercles rouges sont les ROI utilisées pour quantifier la propagation calcique. Les histogrammes en dessous montrent que les agents découplants des jonctions GAP (CBX et 18αGA) et l'ET-1 réduisent de façon significative la propagation des vagues calciques induites par un choc électrique (contrairement au salin et à l'ATP).

Issue de l'article : Le Bourhis et al., 2014.

Ces résultats indiquaient que l'application d'endothéline sur une culture primaire limitait une propagation de signal calcique en partie basée sur la présence de jonctions GAP. Cette action était de plus spécifique car un messager comme l'ATP, capable d'activer comme l'endothéline les cellules de la muqueuse olfactive ne modifiait pas cette propagation **Figure 18 D**).

Au cours de ma thèse, j'ai pu rebondir sur ces résultats en démontrant ce découplage d'une autre manière qui permettait de préciser les cellules affectées, en démontrant ce découplage *in vivo* et enfin en montrant l'impact de ce découplage vis-à-vis de la détection des odorants jusqu'au comportement olfactif.

II. Matériels et Méthodes

A. Animaux

Pour l'ensemble des expériences, nous avons utilisé des rats mâles de souche Wistar (Rattus norvegicus) nés de femelles multipares et hébergés dans nos locaux (Unité Expérimentale Animalerie Rongeurs (uear), Jouy-en-Josas, France). Ils ont été maintenus sous une alternance de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Les animaux avaient à leur disposition de l'eau et une nourriture standard *ad libitum*, et la litière était changée chaque semaine. Toutes les expériences sur ces animaux ont été menées conformément à la directive 2010/63/UE du Conseil des Communautés européennes sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, et approuvés par notre Comité local d'éthique (Comethea, CNREEA # 45 ; approbation du protocole # 12-058). Tous les efforts ont été faits pour réduire le nombre et la souffrance des rats utilisés. L'âge des animaux utilisés pour chaque expérience seront précisés dans les paragraphes concernés.

B. Cultures primaires MO

Les cultures primaires de MO de rat utilisées au cours de cette thèse ont été réalisées à partir d'un protocole établi au laboratoire et décrit par Gouadon et al., 2010. Pour chaque expérience, trois à quatre ratons mâles (Wistar P7 à P10) ont été tués par décapitation. L'ensemble de la MO au niveau des cornets et du septum a été isolée et microdisséquée. Après digestion enzymatique et dissociation mécanique, les cellules ont été resuspendues dans un milieu de culture DMEM / Ham F12 contenant 1,4 g/l de glucose, 10 unités/ml de pénicilline, 10 µg/ml de streptomycine, 2 mM de glutamine (Glutamax) et 10 % de sérum de veau nouveau-né. Les cellules ont été comptées et déposées à environ 700 cellules/mm^2 sur des lamelles de verre préalablement recouvertes de poly -L- lysine. Elles ont été cultivées dans un incubateur à 37 ° C en présence de 5% de CO_2. Après ± 7 jours, les cellules de culture primaire étant quasiment confluentes, l'inhibiteur mitotique 5-

fluoro-2'-désoxyuridine (FUDR, 10 µM) a été ajouté pour bloquer la prolifération cellulaire. A ce stade, les cultures primaires étaient essentiellement constituées de cellules non-neuronales, majoritairement d'OECs et d'une proportion moindre de SCs. Sur ces cultures primaires, des expériences d'électrophysiologie et d'immunocytochimie ont été réalisées.

C. Enregistrements de patch-clamp sur CP

Pour étudier les effets des agents découplant des jonctions GAP (ET-1 et la carbenoxolone : CBX) des expériences électrophysiologiques ont été réalisées sur les cultures primaires de MO décrites ci-dessus. Ces enregistrements ont été effectués à température ambiante, sur des cellules maintenues pendant 7-10 jours *in vitro*. Des lamelles de culture ont été placées dans une petite chambre d'enregistrement montée sur un microscope inversé (Olympus IX71). Elles ont été continuellement perfusées à l'aide d'un système d'écoulement par gravité (2,5 ml / min) avec une solution saline contenant (en mM) : 140 NaCl, 5 KCl, 2 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES, 6 saccharose, glucose 10, pH 7,4, ~ 300 mOsm / L. Le volume de solution recouvrant les cellules a été réduit au minimum afin de limiter les artefacts d'enregistrements (capacitances, résistances en série) et d'accélérer les changements de milieux extracellulaires. Les enregistrements ont été faits sur deux types de cellules non-neuronales : i) les SCs qui ont été identifiées en fonction de leur morphologie plate et pavimenteuse spécifique, et leur localisation en petit regroupements périphériques sur les lamelles. **Figure 19a.** ii) les OECs identifiées grâce à leur morphologie plus fine et allongée, et leurs nombreux prolongements cytoplasmiques. **Figure 19b.** Les différentes molécules testées ont été diluées dans la solution saline et rapidement appliquées de façon extracellulaire par la perfusion ((ET-1 (10^{-7}M) seule ou mixée avec du BQ123 (10^{-6}M), sarafotoxine-6C (10^{-7}M), ATP (10^{-4}M), CBX (10^{-4}M), 18αGA (2.10^{-5}M) et (10^{-4}M)). Les cellules ont été enregistrées en configuration cellule entière en utilisant des pipettes étirées à partir de tubes de verre borosilicate à paroi épaisse (WPI TW150F-4 Thin-Wall Capillary).

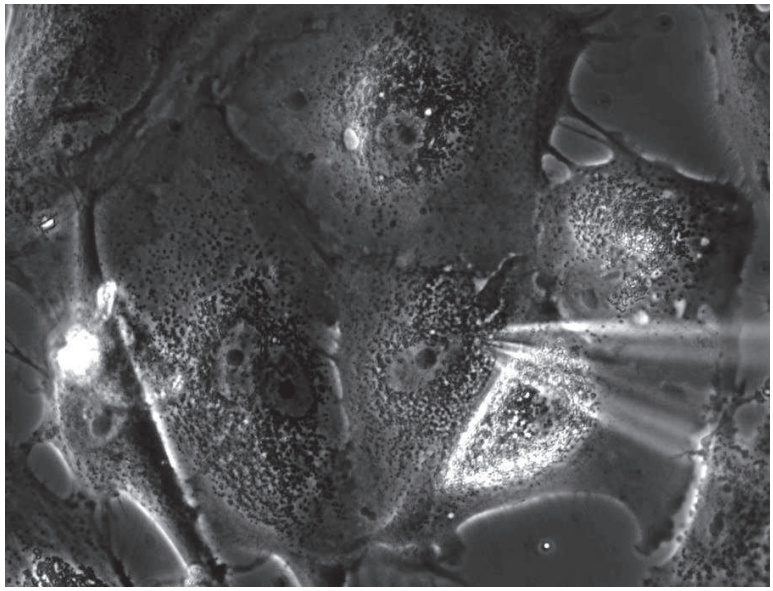


Figure 19a. *Photographie en contraste de phase d'un groupe de SCs en culture primaire.*

La cellule au centre est patchée et enregistrée.

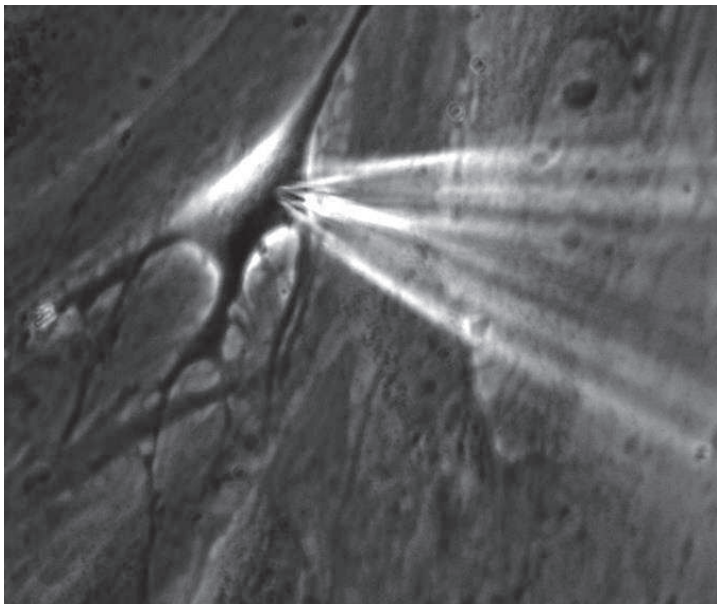


Figure 19b. *Photographie en contraste de phase d'une OEC en culture primaire.*

La cellule est patchée et enregistrée.

Les pipettes présentaient des résistances de 5/6 MΩ une fois remplies avec une solution intra-pipette contenant (en mM) : 140 $KMeSO_4$, 10 NaCl, 0,1 EGTA, 4 MgATP, 0,5 GTP (sel Tris), 10 HEPES, pH 7,4, ~ 300 mOsm / L. Les signaux électrophysiologiques ont été enregistrés au moyen d'un amplificateur Bio-Logic RK 300 dédié au patch-clamp (Bio-Logic SAS, Claix, France), relié à un ordinateur via un convertisseur analogique-digital 1322a Digidata / D (Axon Instruments, Molecular Devices, Union City, CA, USA). Les courants ioniques étaient enregistrés sur des cellules maintenues à un potentiel de repos fixé à -60 mV, en configuration voltage-clamp, au moyen du logiciel pClamp 9.2 (Axon Instruments), filtrés à 0,3 KHz par un filtre passe-bas à 5 pôles Tchebicheff, et numérisés à une fréquence d'échantillonnage de 50 kHz. Le potentiel de jonction avec le milieu extracellulaire était compensé/annulé juste avant l'établissement du contact de la pipette d'enregistrement avec la cellule. Les mesures de résistance membranaire ont été réalisées à partir d'enregistrements des courants capacitifs induits par une hyperpolarisation de 20mV pendant 400ms sur clampfit 9.2. (Axon Instruments).

D. Immunocytochimie

Afin de confirmer l'identité des cellules enregistrées, l'expression de protéines spécifiques a été recherchée par immunocytochimie post-hoc sur les cellules patchées. La cytokératine 18 (CK18 (Williams *et al.*, 2004)) a été choisie comme marqueur spécifique des SCs alors que l'expression de la protéine S100β (Barber & Lindsay, 1982) a été retenue pour identifier les OECs. Après chaque enregistrement d'une cellule par patch-clamp, un marquage du champ optique contenant la cellule enregistrée, visualisé sous l'objectif du microscope, a été effectué par dépôt de microbilles fluorescentes. Ce marquage avait pour but de faciliter le repérage macroscopique de la zone de la lamelle dans laquelle se trouvait la cellule enregistrée après marquage immunocytochimique. Les lamelles de culture contenant les cellules enregistrées ont été fixées avec une solution fraîchement préparée de paraformaldéhyde à 4% dans une solution de tampon phosphate (PBS). Les

cellules ont été perméabilisées et le signal non spécifique a été bloqué par incubation pendant 1h à température ambiante avec une solution de PBS contenant 2 % de BSA, 0,1% de Triton X-100, et 10% de sérum de l'espèce animale chez laquelle l'anticorps secondaire utilisé a été généré. Les cellules ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4° C avec des anticorps primaires dirigés contre CK18 (1:50, anticorps monoclonal de souris, Servibio, Meudon, France) ou contre S100β (1:1000, anticorps polyclonal de lapin, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) dilués dans du PBS contenant 0,2 % de BSA et 0,05 % de Triton X-100. Après rinçage, une seconde incubation d'une heure a été réalisée avec un anticorps secondaire fluorescent anti-souris (Alexa Fluor -488) ou anti-lapin (Alexa Fluor -546) (1:1000 ; Molecular Probes, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Enfin, les lamelles ont été rincées plusieurs fois dans du PBS et scellées sur une lame avec du milieu de montage DAPI - Vectashield (AbCys, Paris, France).

E. Évaluation de la mort cellulaire par la mesure de la libération de lactate déshydrogénase

Des études réalisées au sein de l'équipe avant mon arrivée ont montrées que l'endothéline est neuroprotectrice au sein de l'épithélium olfactif (Laziz *et al.*, 2011) comme dans différentes régions du SNC. Un lien a été démontré entre neuroprotection et découplage des jonctions GAP notamment dans le cortex somatosensoriel (Wang 2013). Afin de déterminer si l'effet neuroprotecteur de l'endothéline implique un découplage des jonctions GAP, nous avons évalué et comparé la mort cellulaire au sein de cultures cellulaires de 7 jours placées en présence ou non d'endothéline ou de CBX à différentes concentrations. La mort cellulaire induite par privation de sérum pendant 24 heures a été évaluée par la quantification de la libération de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture (Laziz *et al.*, 2011). La concentration de LDH est proportionnelle à la vitesse d'oxydation du NADH quantifiée par des mesures d'absorbance à 355nm. Nous avons mesuré les activités de la LDH extracellulaire et intracellulaire,

respectivement à partir du milieu de culture et à partir de lysats des cellules adhérentes extemporanément traitées avec du PBT (PBS + 0,5 % de triton X-100). La libération de LDH dans le milieu de culture a été exprimée comme un pourcentage de la LDH totale mesurée (milieu de culture + cellules adhérentes lysées).

F. Préparations de tranches de MO et de BO

Les tranches de MO et de BO ont été réalisées à partir de ratons mâles Wistar (P0-P3 et P10-13 respectivement) tués par décapitation. Pour les tranches de MO, la partie antérieure de la tête comprenant la cavité nasale, débarrassée de l'os du crâne, de la mâchoire inférieure et du palais, a été incorporée dans de l'agarose à bas point de fusion à 4 %, placée à froid (~0°C) dans du liquide artificiel céphalo-rachidien (ACSF) contenant (mM) : 124 NaCl, 5 KCl, 1,25 NaH_2PO_4, 2 $MgSO_4$, $CaCl_2$ 2, 26 et 10 glucose $NaHCO_3$ saturé avec 95 % de O_2 et 5% CO_2, à pH 7,4, ~ 300 mOsmol / L.

Pour la préparation de tranches de BO, les bulbes olfactifs ont été rapidement et soigneusement disséqués dans de l'ACSF froid.

Pour les deux préparations, les blocs comprenant les tissus ont été collés sur la platine d'un vibratome VT1200S (Leica Microsystems, LEICA Microsystèmes SAS, Nanterre, FRANCE), au moyen duquel des tranches coronales (250-300 µm) ont été réalisées puis maintenues immergées dans de l'ACSF oxygéné et à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

G. Imagerie calcique sur tranches de MO et BO

Nous avons utilisé l'imagerie calcique sur tranches afin d'identifier les cellules activées *ex vivo* par l'ET-1 et d'en caractériser les réponses physiologiques.

Les concentrations de calcium intracellulaires ont été mesurées au moyen d'une sonde calcique fluorescente, l'Oregon Green BAPTA–1 – AM (OGB-1 ; ex. 488nm – em. 535nm). Les tranches ont été chargées 30 à 40 min

à 37°C, dans de l'ACSF oxygénée contenant 8.10^{-6}M d'OGB-1 (préparé à partir d'une solution stock à 2 mM dans du DMSO, mélangée 1:1 avec 20 % de Pluronic F -127). Après une période de repos d'au moins 15 min dans l'ACSF oxygéné, les tranches ont été transférés dans une chambre d'enregistrement perfusée en continu par gravité avec de l'ACSF oxygéné à un débit de 2,5 à 3 ml / min. Cette chambre a été placée sur la platine d'un microscope droit (BX51WI, Olympus, Rungis, France), muni d'un objectif à immersion 20x (XLUMPLFL20XW, NA, 0,95), et doublement équipé d'un contraste inter-différentiel, d'une illumination et d'une caméra infra-rouge d'une part, et d'une station d'imagerie en épifluorescence (Xénon-Mercure) en temps réel CellR (Olympus, Soft Imaging Solutions - OSIS, Münster, Allemagne) pilotée par le logiciel Xcellence RT d'autre part. Les acquisitions d'images ont été réalisées à la fréquence de 1 Hz, avec des temps d'exposition minimal (10-100 ms), au moyen d'une caméra EM- CCD refroidie C9100 -13 (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Les réponses des cellules non-neuronales dans des tranches de MO et de BO à l'application par perfusion d'ET-1 (10^{-7}M), de sarafotoxine-6C (10^{-7}M) ou d'ATP (10^{-4}M) ont ainsi été étudiées

Pour les analyses de ces réponses calciques dans les tranches de MO et de BO, des régions d'intérêt (ROI) ont été utilisées. Pour les tranches de MO, des ROIs de deux types ont été délimitées : des ROIs larges, la première entourant la région autour des noyaux de SCs, correspondant aux 25 % apicaux de l'épithélium olfactif (Moon *et al.*, 2009), et la seconde recouvrant la zone des cellules engainantes dans la lamina propria (Rela *et al.*, 2010), et des ROIs délimitant des SCs individualisées pour détailler leur activité spécifique. Pour les tranches de BO, des ROIs de taille variable, allant de une à quelques cellules, localisés dans la couche du nerf olfactif, à la périphérie du BO ont été tracées. Les variations de fluorescence (et donc de concentration de calcium intracellulaire) ont été normalisées par rapport à la moyenne de fluorescence à l'état basal (30s précédant la stimulation) et

exprimés en %ΔF/F = ([(F - Fbaseline)/Fbaseline]x100) en utilisant le logiciel Xcellence RT.

H. Explants de MO

Pour étudier les effets de l'ET-1 et de certains découplants des jonctions GAP sur la propagation de réponses calciques au travers des cellules non-neuronales de la MO dans des conditions encore plus physiologiques, des explants de MO ont été mis au point. Ces explants ont été obtenus selon une procédure très similaire à celle de la préparation des tranches à partir de ratons mâles Wistar (P0-P3) tués par décapitation. La partie antérieure de la tête comprenant la cavité nasale, débarrassée de l'os du crâne, de la mâchoire inférieure, et du palais, a été placée dans de l'ACSF glacé (voir ci-dessus). Deux incisions sagittales bilatérales du bloc au niveau caudal (lame criblée) ont permis la séparation et l'obtention de la cloison septale qui sépare les deux cavités nasales (le septum), recouverte de MO de part et d'autre. Ce septum a été laissé au repos dans de l'ACSF oxygéné à température ambiante jusqu'à l'utilisation de l'un des deux explants de MO le recouvrant.

I. Imagerie de calcium et stimulations électriques sur explant

Comme pour les tranches de MO, l'Oregon Green a été choisi comme fluorophore calcique (OGB-1 : stock à 2 mM dans du DMSO, mélangé 1:1 avec 20 % de Pluronic F -127, Molecular Probes, diluée 8.10^{-6}M dans de l'ACSF oxygénée, temps de chargement de 30 à 40 minutes, à 37°C et à l'abri de la lumière). Une des MO encore fixée au septum a été délicatement détachée puis déposée à plat, sous un filet de nylon, avec la face apicale dirigée vers le haut, dans la même chambre d'enregistrement placée sur le même dispositif expérimental de microscopie à fluorescence / DIC / IR que pour les tranches (voir ci-dessus).

Pour évaluer le couplage entre SCs par jonctions GAP, nous avons appliqué des stimulations électriques ponctuelles à la surface des explants de MO, et suivi la propagation de la réponse calcique générée par cette stimulation au-travers des SCs voisines. Ces chocs électriques ont été délivrées par une pipette bipolaire de stimulation en verre thêta remplie avec une solution de NaCl 1 M. La pipette a été placée à effleurement du tissu, au-dessus d'une SCs visualisée en DIC / IR. Tout comme pour les tranches, les changements de fluorescence ont été normalisées par rapport à la moyenne de fluorescence à l'état basal (30 s précédant la stimulation) et exprimés en %ΔF/F = ([(F - Fbaseline) / Fbaseline] x100) en utilisant un logiciel Xcellence RT. Afin de quantifier la propagation de la stimulation électrique par GAP jonction sur des explants MO, dans les différentes conditions étudiées, deux ROIs concentriques ont été dessinées et centrées sur l'électrode de stimulation **(Voir Figure 24b**). Les intensités relatives de fluorescence ont été mesurées en unités arbitraires en utilisant un logiciel Xcellence RT. Les ratios de fluorescence de chaque ROI ont été comparés dans les conditions avec ACSF ou avec les différentes molécules testées (ET-1 (10^{-7}M), ATP (10^{-4}M), CBX (10^{-4}M)).

J. Electro-olfactogrammes (EOG)

Pour évaluer l'impact de la modulation des jonctions GAP sur les réponses olfactives, des enregistrements d'EOG ont été réalisés sur des hémi-têtes de rats Wistar (P10-P15) (Lacroix *et al.*, 2008; Negroni *et al.*, 2012). Après euthanasie par décapitation de l'animal, une coupe sagittale a été effectuée pour séparer la boîte crânienne en deux parties, et le septum a été retiré délicatement pour exposer les cornets olfactifs. La première hémi-tête ainsi formée a été placée sur glace dans la chambre d'enregistrement et la seconde hémi-tête a été conservée sur glace et à l'obscurité. L'hémi-tête enregistrée a été maintenue sous un flux constant d'air filtré humidifié (~1200 ml / min) appliqué à travers un tube de verre placé à 2 cm de la surface de l'épithélium et centré sur les cornets enregistrés. Les stimulations odorantes ont

été réalisées par l'application de bouffées d'air (100 ms, 300 ml / min) à travers une pipette Pasteur, interchangeable, enfermée dans le tube de verre et contenant un papier filtre imprégné avec 20 µL d'acétate d'isoamyle (IA ; Sigma Aldrich (Saint- Quentin Fallavier, France)), dilué au 1 : 100ème dans de l'huile minérale neutre. Les potentiels de champs induits à la surface de deux différents cornets voisins par l'application d'odorants ont été enregistrés simultanément au moyen de deux micropipettes en verre de 4/5 MΩ de résistance d'accès, remplies avec une solution saline proche de la composition du mucus : solution Mucus (45mM KCl, 20mM $KC_2H_3O_2$, 55mM $NaCH_3SO_4$, 1mM $MgSO_4$, 5mM $CaCl_2$, 10mM d'HEPES, 11mM de glucose, pH 7,4, Ω = 350mOsm/L ajustée avec du mannitol). Les électrodes d'enregistrement ont été placées au centre et à la surface de ces cornets. Cette position a donné des enregistrements d'EOG robustes, reproductibles et durables. Les variations de potentiel induites par l'odorant ont été amplifiées par un double amplificateur extracellulaire XC2 (DIPSI, Châtillon, FRANCE), filtrées par un filtre passe-bas Bessel à 1 kHz, numérisés à une fréquence de 2 kHz à l'aide d'un convertisseur analogue-digital 1322a Digidata (Axon Instruments, Molecular Devices, Union City, CA, USA) et stockées dans un ordinateur au moyen du logiciel pClamp (version 9.2, Axon Instruments). Une électrode de référence Ag / AgCl a été placée derrière la lame criblée, dans le BO. Les réponses évoquées par l'acétate d'isoamyle ont été enregistrées le plus souvent possible sur les cornets IIb et III. En conditions « contrôle », la stimulation par de l'huile minérale seule a toujours produit des signaux faibles, de moins de 1mV d'amplitude.

En début d'expérience, les réponses EOG ont été enregistrées jusqu'à ce que leurs amplitudes soient stabilisées (au moins 3 réponses successives de même amplitude), et la dernière réponse a été prise comme valeur de référence. Un des cornets a ensuite été traité par une application locale de la solution Mucus seule, tandis que l'autre cornet a été traité avec une application locale de la solution Mucus contenant 10^{-6}M d'ET-1 ou 10^{-4}M de CBX. L'application locale, par l'intermédiaire de deux micropipettes de verre

d'un diamètre à son extrémité d'environ 5-10 µm, a permis une diffusion par capillarité des solutions déposées en continu sur chaque cornet. Le cornet traité (ET-1 ou CBX) et le cornet contrôle (solution Mucus) ont été systématiquement alternés d'une hémi-tête enregistrée à l'autre. Les réponses à l'acétate d'isoamyle ont été enregistrées simultanément sur les deux cornets toutes les 2 minutes, avant puis pendant les 20 minutes qui suivent le début du traitement. Les effets de l'ET-1 et de la CBX ont été évalués respectivement sur 6 rats chacun. L'analyse des signaux a été effectuée hors- ligne à l'aidedu logiciel Clampfit 9.2 (Axon Instruments). Sur les réponses EOG, les paramètres d'amplitude, le temps de dépolarisation (de 10% à 90%), le temps et les pentes de repolarisation rapide (de 95% à 75%) et lente (de 40% à 10%) ont été mesurés. Les valeurs de l'amplitude et des cinétiques des signaux olfactifs suivant les applications locales ont été normalisées à celles des enregistrements contrôle d'avant traitement.

K. Comportement

Afin de mesurer l'impact des agents découplant de jonction GAP au sein de la MO, des expériences de comportement ont été réalisées sur de jeunes ratons mâles wistar (P10). Ils ont été séparés de leur mère 45 minutes avant le test et maintenus au chaud. Issus de la même portée, ils ont été pesés, puis divisés en deux groupes : l'un est le contrôle interne, l'autre est le groupe test. Les ratons ont alors été marqués au feutre (POSCA très peu d'odeur) au-dessus de la tête et du bassin. Après 35 minutes d'isolement, chaque raton reçoit dans chacune des cavités nasales 10 µL de solution saline (contrôle) ou de drogues diluées dans cette solution (tests) (ET-1 : 10^{-6}M ; BQ : 10^{-5}M ; BQ : 10^{-5}M + ET- 1 : 10^{-6}M ; CBX : 10^{-4}M). Après 10 minutes, ils effectuent un test de choix dans un labyrinthe en T, réalisé en plastique transparent, sans fond et rectangulaire (L x l x H : 29,7 x 18,7 x 5,5 cm). La boîte a été munie d'un couvercle transparent articulé à une extrémité pour permettre un accès facile. Un petit ventilateur (40 x 40 x 10 mm, 28L.min) a été monté à l'opposé des sources odorantes, et permet d'extraire l'air de la

boîte (équivalent à 9 volumes de boîte par minute). À l'autre extrémité de chaque côté de la boîte, deux prolongements perpendiculaires ont été positionnés (L x l x H : 16,8 x 6,8 x 5,5 cm3) pour former un T. Les jonctions entre la boîte et les prolongements ont été perforées afin de laisser passer les odeurs tout en empêchant les ratons d'accéder complètement aux sources odorantes. Le test auquel sont soumis les ratons est un test de choix entre l'odeur de sciure de bois propre d'un côté et l'odeur de la sciure souillée provenant de la cage de leur mère de l'autre côté. Avant chaque essai, une feuille de papier A4 propre et dépourvue d'odeur a été placée sous la boîte de test, couvrant la totalité du sol. Chaque feuille avait un cercle imprimé au centre pour assurer la même position de départ à l'intérieur du dispositif pour tous les animaux. Pour le test, chaque raton a été placé délicatement dans le centre et laissé libre de se déplacer à l'intérieur. La fin du test a été déterminée lorsque le raton touche avec son nez une paroi perforée de la boîte, ce qui a constitué un choix. La durée maximale du test a été toutefois délimitée à 60 secondes si aucun choix n'a été effectué. L'ordre de passage des animaux testés a été effectué de façon alterné entre les groupes, et une fois le test réalisé, le raton a été replacé avec sa mère. Une caméra vidéo a été positionnée au-dessus du dispositif et tous les tests ont été filmés (25 images par seconde). Les données vidéo collectées ont été analysées par une méthode d'analyse de l'orientation du raton et le calcul d'un produit scalaire (Meunier & Nielsen, 2014). Le mouvement de chaque raton pendant le test a été suivi à l'aide d'un programme gratuit Kinovea 0.8.15 (www.kinovea.org). Les deux points de marquages dorsaux (tête et bassin) ont été utilisés pour obtenir des coordonnées image par image (25 images/s). Les coordonnées spatiales ont été transcrites en pixels par rapport avec le coin inférieur gauche du dispositif désigné comme origine.

III. Résultats

A. ET-1 et CBX découplent les jonctions GAP *in vitro*

Les expériences préalablement effectuées au laboratoire montrent que l'ET-1 induit des réponses calciques dans les cellules non-neuronales de la MO en CP. Parallèlement, l'ET-1 semble, comme la CBX, limiter la propagation d'informations en modulant les jonctions GAP. Afin de vérifier ce dernier élément, j'ai mis à profit la formation à la technique de patch-clamp reçue au cours de mon stage de master 1, pour mesurer l'évolution de la résistance membranaire de cellules non-neuronales. Celle-ci reflète la capacité de diffusion de charges électriques à travers la membrane plasmique, librement ou par des canaux (comme peuvent l'être les jonctions GAP). En début de thèse, j'ai repris ces expériences d'électrophysiologie pour caractériser les effets des découplants de jonctions GAP sur les SCs et les cellules engainantes. En culture, les SCs et les OECs se différencient facilement par leur morphologie. Les SCs sont plates, larges, pavimenteuses, et regroupées au sein de petits ilots de quelques centaines de µm de diamètre. **Figure 20a.** Les OECs ont un corps cellulaire bombé d'où émergent de nombreux prolongements cytoplasmiques. Les OECs sont majoritairement représentées dans la CP. **Figure 20b.** Une fois patché les deux types cellulaires ont présenté les mêmes caractéristiques électrophysiologiques : ~200MOhm de résistance, ~-40mV de potentiel de membrane au repos. Les reconnaitre sous le microscope fut une chose acquise relativement rapidement, mais il a fallu les identifier de façon certaine par immunocytochimie. Les marqueurs CK18 pour les SCs et Sβ100 furent utilisés pour certifier leur nature à posteriori des expériences d'électrophysiologie.

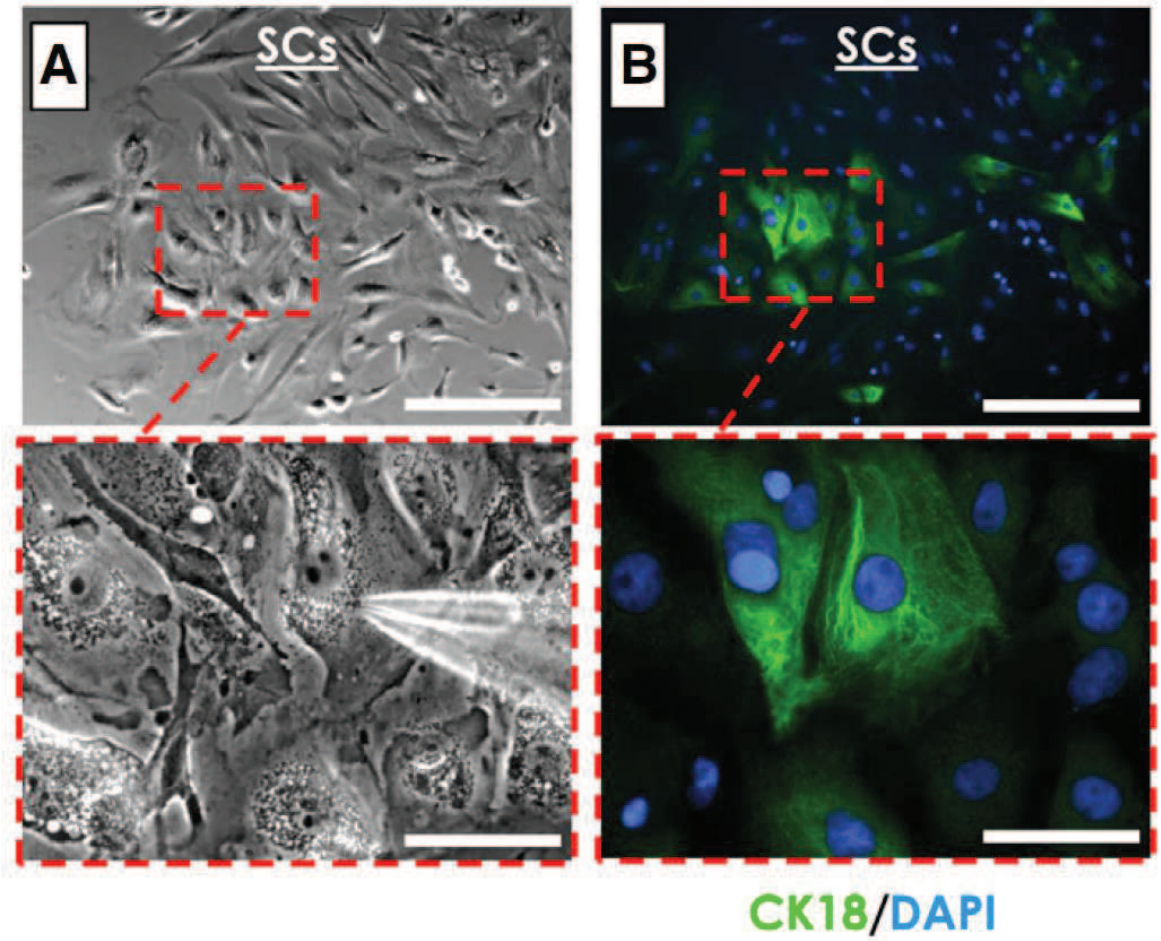


Figure 20a. *SCs en culture primaire, patchées, et marquage CK18.*

A Photo en contraste de phase de SCs regroupées. En dessous, l'encadré rouge, un agrandissement où l'on voit la cellule enregistrée. **B** Résultat de l'immunocytochimie CK18 du même champ et du même agrandissement. Le marquage CK18 est en vert et les noyaux ont été révélés par un marquage DAPI en bleu sur la photo. Il n'y a aucun doute sur le fait que la cellule patchée et immunopositive CK18, sa morphologie, ses caractéristiques électrophysiologiques et l'expression de ce marqueur spécifique confirment sa nature : la cellule patchées est une SCs. Echelle : photos du haut : 200µm, photos du bas 50µm.

Issues de l'article : Le Bourhis et al., 2014.

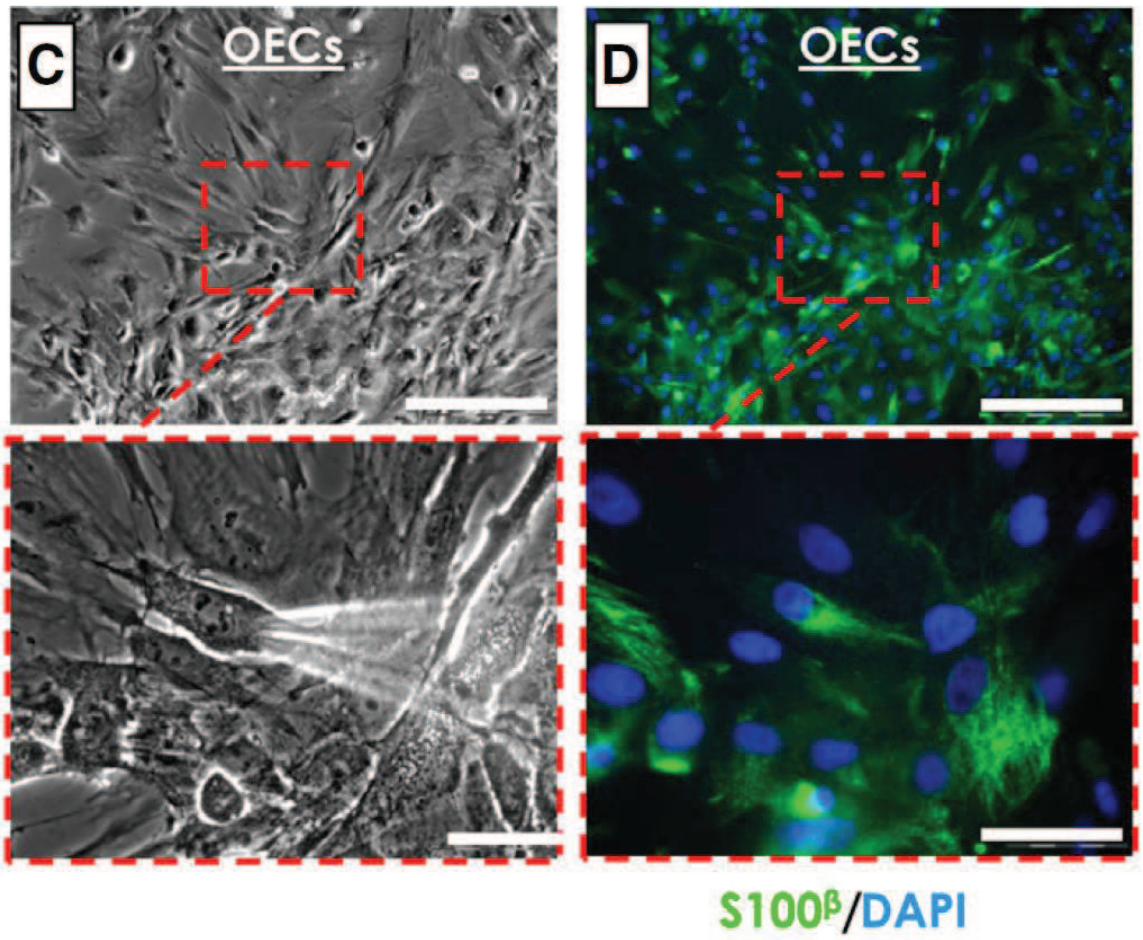


Figure 20b. *OECs en culture primaire, patchées, et marquage S100β.*

C Photo en contraste de phase d'OECs. En dessous, l'encadré rouge, un agrandissement où l'on voit la cellule enregistrée. **D** Résultat de l'immunocytochimie S100β du même champ et du même agrandissement. Le marquage S100β est en vert et les noyaux ont été révélés par un marquage DAPI en bleu sur la photo. Il n'y a aucun doute sur le fait que la cellule patchée et immunopositive S100β. Sa morphologie, ses caractéristiques électrophysiologiques et l'expression de ce marqueur spécifique confirment sa nature : la cellule patchées est une OECs. Echelle : photos du haut : 200µm, photos du bas 50µm.

Issue de l'article : Le Bourhis et al., 2014.

J'ai pu mesurer la résistance membranaire avant et après application des agents découplants. J'ai alors pu faire le ratio de ces valeurs et les comparer entre les différentes molécules testées. **Figure 20c.** Les résultats électrophysiologiques ont montré que l'application de CBX à 10^{-4}µM augmente de façon significative (+~100%) la résistance membranaire des SCs et des OECs. Fidèle aux données bibliographiques dans d'autres tissus, l'application d'ET-1 à 10^{-7}M a induit elle aussi une forte augmentation de la résistance membranaire (~+60%) pour les deux types cellulaires. **Figure 20d.** L'application préalable d'antagonistes spécifiques des récepteurs à l'ET-1 (BQ123 pour ET_A et BQ788 pour ET_B en mélange à 10^{-6}M ; BQs), n'a pas eu d'effet direct sur la résistance membranaire, mais elle a fortement inhibé l'action de l'ET-1 appliquée en présence de ces antagonistes (seulement ~+10% d'augmentation de la résistance membranaire en présence des BQs; **Figure 20d**). Afin de préciser les récepteurs à l'endothéline impliqués dans cette augmentation, j'ai appliqué de la sarafotoxine, S6C, agoniste spécifique des récepteur ET_B. Ce dernier n'a pas induit de modification significative de la résistance membranaire. Ce résultat est cohérent avec les données précédentes obtenues au laboratoire montrant que les cellules non-neuronales de la muqueuse olfactive expriment principalement ET_A. L'augmentation de la résistance membranaire des SCs et des OECs, induite par ET-1 passe donc vraisemblablement par les récepteurs ET_A.

L'ET-1 et la CBX ont montré des effets très comparables. La CBX est un agent reconnu découplant des jonctions GAP dans de nombreux tissus. La fermeture de jonctions GAP se traduit par la fermeture de canaux ce qui se traduit par une augmentation de la résistance membranaire. C'est bien ce que nous avons observé avec la CBX et l'ET-1. Ces résultats, couplés à ceux obtenus avec les stimulations électriques et les données bibliographiques (Blomstrand *et al.*, 2004; Blomstrand & Giaume, 2006; Tence *et al.*, 2012) sont cohérents avec une action découplante des jonctions GAP de l'endothéline sur les cellules gliales de la MO.

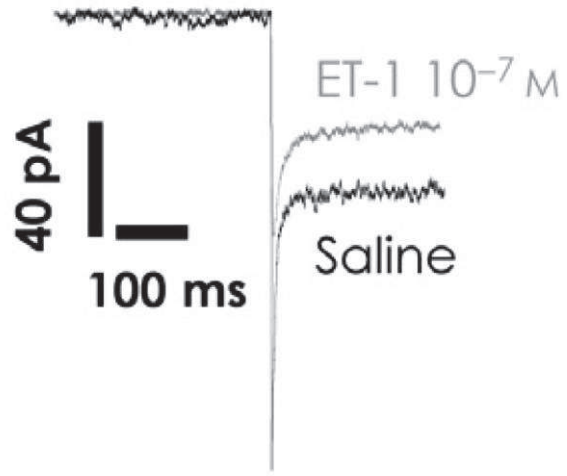


Figure 20c. *L'ET-1 et la CBX modifient la résistance membranaire.*

La technique de patch clamp a permis de mesurer la résistance membranaire de SCs et de OECs en culture primaire de MO. Un exemple de réponse des courant enregistrés d'une SCs suite à saut de potentiel de -60mV à -80mV. En gris foncé, la réponse en condition contrôle (Saline) et gris clair la réponse en présence d'ET-1.

Issue de l'article : Le Bourhis et al., 2014.

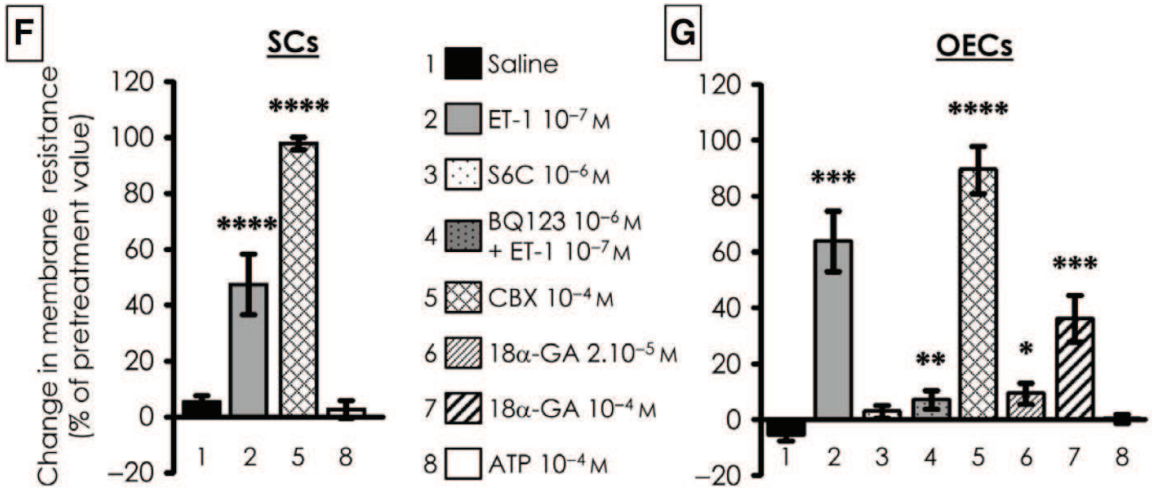


Figure 20d. *L'ET-1 et la CBX augmentent la résistance membranaire des SCs et OECs.*

F La résistance membranaire des SCs et d'OECs en culture primaire de MO a été enregistrée à la suite d'application d'ET-1, CBX, 18aGA, S6C, BQ ou ATP. Contrairement au OECs (**G**), moins de molécules ont été testé sur les SCs du à la difficulté de patcher ces cellules. Le changement de résistance est exprimé en % de la résistance avant l'application.

SCs: saline, n = 8; 10^{-7}M ET-1, n = 18; 10^{-4}M CBX, n = 19; 10^{-4}M ATP, n =13.
OECs: saline, n = 12; 10^{-7}M ET-1, n = 16; 10^{-7}M S6C, n = 8; 10^{-7}M ET-1 + 10^{-6}M BQ123, n = 8; 10^{-4}M CBX, n = 21; 2.10^{-5}M 18a-GA, n = 5; 10^{-4}M 18aGA, n = 9; 10^{-4}M ATP, n = 14.

*P ≤ 0.05; **P ≤ 0.01; ***P ≤ 0.001 and ****P ≤ 0.0001.

Issue de l'article : Le Bourhis et al., 2014.

Pour la suite, seule la CBX a été conservée comme contrôle positif pour découpler les jonctions GAP. En effet, les essais conduits avec un second découplants des jonctions GAP, le 18aGA, ont montré un effet limité de ce dernier dans les expériences de stimulations électriques/propagation de signal calcique, tout comme dans les expériences de patch-clamp. De plus les expériences sur le découplage des jonctions GAP *in vivo* se sont révélées très délicates (données développées dans la partie D des résultats). Cela nous a donc conduits à écarter cette molécule pour la suite de nos expériences.

B. Possible implication des jonctions GAP dans les mécanismes anti-apoptotique *in vitro*

Les données déjà publiées montraient dans les cellules de MO en culture primaire que l'ET-1, d'une part, activait les cellules gliales de la MO de façon calcium-dépendant (Gouadon *et al.*, 2010), d'autre part était anti-apoptotique lorsque ces cellules subissaient un stress fort comme la privation de sérum dans le milieu de culture (Laziz *et al.*, 2011). Des résultats d'expériences préliminaires et de début de thèse montraient de plus que l'ET-1 limitait la propagation de vague calcique induite par une stimulation électrique, vraisemblablement en découplant les jonctions GAP entre cellules gliales de la MO. Par ailleurs, il est décrit que le découplage des jonctions GAP peut limiter la propagation de signaux pro-apoptotiques (Park *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Les actions de l'ET-1 sur la survie cellulaire et sur les jonctions GAP pouvaient-elles alors être liées ? Si l'action de découpler les jonctions GAP induisait un rôle anti-apoptotique, alors la CBX devrait également l'être. Pour tester ceci, nous avons à nouveau utilisé les CP de MO que nous avons placées en privation de sérum pour induire l'apoptose, comme cela avait déjà était fait au laboratoire (Laziz *et al.*, 2011). Nous avons parallèlement traité les cellules avec de l'ET-1 ou de la CBX. Puis nous avons mesuré l'activité de la LDH grâce à la disparition de NADH ajouté dans le milieu. En effet la LDH est libérée lorsque les cellules meurent, donc sa

concentration dans le milieu extracellulaire augmente, et catalyse proportionnellement l'oxydation du NADH en NAD+. Cette disparition de NADH est suivie par absorbance puisque cette molécule absorbe dans l'UV. La pente relative à la disparition du substrat de la LDH est donc proportionnelle à la quantité de LDH présente dans le milieu cellulaire. Une fois rapportée à la quantité de LDH présente dans les cellules de la culture primaire, on peut extraire un pourcentage de LDH extracellulaire qui reflète la mort cellulaire dans la culture. En conditions standards de culture (sérum), le pourcentage de LDH relargué dans le milieu extra cellulaire était équivalent avec ou sans traitement avec l'ET-1 (10^{-7}M) ou la CBX (10^{-4}M). **Figure 21.** Ce résultat a donc permis de vérifier que ces molécules n'affectaient pas le niveau basal de mort cellulaire. Lorsque les cellules ont été privées de sérum (serum free, **Figure 21**), le taux de LDH, et donc la mort cellulaire, ont fortement augmenté en conditions contrôles. Comme montré précédemment au laboratoire, la mort cellulaire induite par privation de sérum est essentiellement liée à une augmentation de l'apoptose caspase-dépendante (Laziz *et al.*, 2011). Les traitements avec l'ET-1 ont permis de confirmer l'action anti-apoptotique de ce peptide dans ces conditions, où le niveau de LDH relargué dans le milieu extracellulaire a été significativement plus faible que celui du contrôle. **Figure 21.** Toutefois les résultats obtenus avec la CBX ont été plus compliqués à interpréter. Les faibles doses de CBX (10^{-6}M et 10^{-5}M) n'ont pas modifié le pourcentage de mort cellulaire, qui est resté statistiquement équivalent à celui du contrôle. Toutefois en présence d'une concentration plus forte (10^{-4}M, concentration classiquement utilisée pour induire une fermeture des jonctions GAP), nous avons observé un pourcentage de mort cellulaire fortement augmenté par rapport au contrôle. Alors que nous attendions une diminution de l'apoptose par les agents découplants des jonctions GAP, nous avions ici l'effet inverse. Certaines données de la littérature montrent cependant que la CBX peut avoir un effet délétère (pro-apoptotique) sur des cellules lorsque celles-ci sont en conditions défavorables (Ozog *et al.*, 2002), ce qui était clairement le cas dans nos expériences. Ces dernières ne permettaient donc pas d'établir de manière

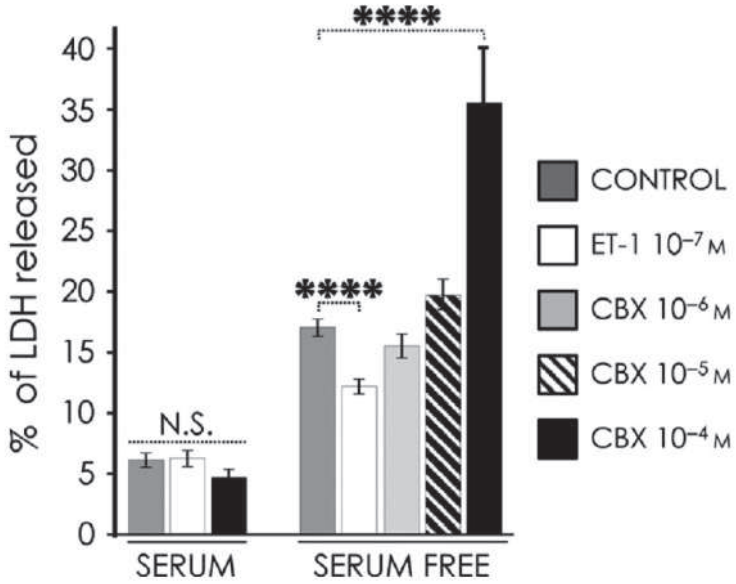


Figure 21. *Implication relative des jonctions GAP dans le rôle antiapoptotique de l'ET-1.*

La privation de sérum dans le milieu de culture des cellules induit une mort cellulaire mesurable par le % de LDH libérée. L'ET-1 et la CBX ne sont pas toxiques pour les cellules en culture en présence de sérum. Alors que l'ET-1 est protecteur pour les cellules suite à une déprivation de sérum, la CBX à forte dose augmente la mort cellulaire. ****P ≤ 0.0001.

Issues de l'article : Le Bourhis et al., 2014.

convaincante et définitive un lien direct entre l'action anti-apoptique de l'ET-1 sur les cellules de la MO et son action sur les jonctions GAP.

C. ET-1 induit une activation calcique des cellules gliales de la MO

Jusque-là, nous avions pu montrer que l'ET-1 agissait sur les cellules gliales de la MO en induisant des réponses calciques et en découplant les jonctions GAP comme la CBX. Ces données *in vitro* étaient à confirmer *in vivo*. Un beau défi technique de ma thèse fut de mettre au point des tranches de MO viables et fonctionnelles pour réaliser des expériences d'imagerie et d'électrophysiologie sur les différents types cellulaires de la MO ; cette préparation de tranches de MO nous a posé plusieurs problèmes. Contenu dans les fosses nasales, la MO est donc entourée d'os, et repose elle-même sur les expansions cartilagineuses de l'éthmoïde qui durcissent à mesure que l'animal vieillit. Il a donc fallu prendre de jeunes ratons (P0-P3) pour pouvoir couper au vibratome les blocs contenant la MO. A cet âge, les os ne sont pas encore très durs et peuvent être coupés plus facilement. Pour obtenir de belles tranches de tissu exploitables, il a néanmoins fallu inclure le bloc de tissu dans de l'agarose à faible température de fusion, pour immobiliser les différents cornets et donner de la rigidité au bloc tout en respectant l'intégrité du tissu. Enfin la MO se trouvant essentiellement au fond des cavités nasales, l'angle de coupe a été optimisé en positionnant les BO vers le haut et l'os du crane faisant face la lame du vibratome. Après ces mises au point, j'ai pu obtenir des tranches de MO, que j'ai pu charger au moyen d'une sonde sensible au calcium, l'Oregon Green, et visualiser ainsi l'évolution de la concentration de calcium intracellulaire en réponse à des stimulations par différentes molécules. **Figure 22a.** Les réponses aux applications d'ET-1 (10^{-7}M) et de S6C (10^{-7}M) ont été comparées à celles obtenues avec de l'ATP (10^{-4}M), qui a été utilisée comme contrôle positif de réponse calcique. En effet l'ATP est connue pour induire de fortes réponses calciques dans les SCs (Hegg *et al.*, 2009).

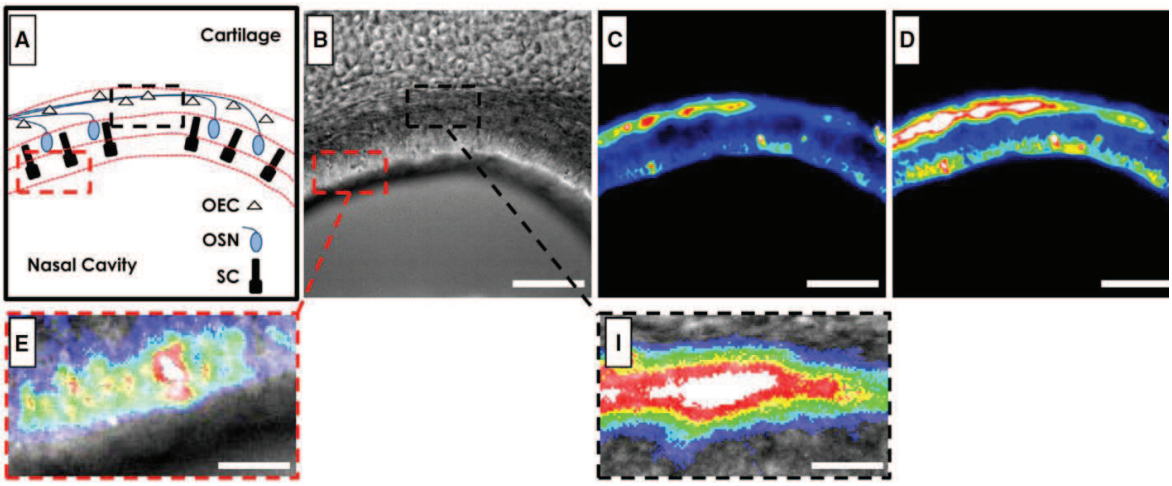


Figure 22a. *L'ET-1 induit des réponses calciques des SCs et des OECs.*

A Représentation schématique de la coupe de MO en **B. C; D** Même coupe en epifluorescence avant et après application de l'ET-1. Echelle 100µm. **E; F** Agrandissements respectifs des zones des SCs et des OECs. Echelle 25µm.

Issue de l'article : Le Bourhis et al., 2014.

Le champ d'observation microscopique relativement large (objectif 20x) a permis de suivre simultanément les différents types cellulaires présents dans la MO : les SCs, les neurones et les OECs. Des ROIs sur les régions de ces différents types cellulaires ont été dessinées après l'acquisition des données et ont permis de suivre l'évolution de la concentration calcique des cellules à la suite de l'application des différentes molécules testées. **Figure 22a.** Les expériences n'ont révélé aucune réponse calcique significative des neurones olfactifs à ces molécules. Les SCs et les OECs ont quant à elles montré des réponses claires et prononcées à l'ET-1 et l'ATP. La S6C n'a pas eu d'effet significatif sur ces populations cellulaires. **Figure 22b.** Les SCs ont dévoilé une sensibilité à l'ET-1, leur réponse a été caractérisée comme lente et prolongée avec un plateau maximal d'activation équivalent à 10% du niveau basal. La réponse à l'ATP des SCs fut beaucoup plus rapide, et intense, avec également un plateau à 20% par rapport au niveau de base. Les OECs ont présenté le même profil de réponse à l'ATP que les SCs, les cinétiques et amplitudes de réponses se sont révélées équivalentes. Toutefois, la réponse des OECs à l'ET-1 a été beaucoup plus forte que celles des SCs avec un maximal d'intensité à 20% par rapport au niveau basal. Il est intéressant de noter que l'augmentation de calcium induite par l'ET-1 fut plus lente à se développer et atteindre un maximum/plateau que celle induite par l'ATP, et ce pour les deux types cellulaires. **Figure 22b.** A la vue des premiers enregistrements, nous avons poussé l'analyse des réponses calciques induites par l'ET-1 sur les SCs individualisées. Pour des raisons de contraction de tissu à la suite d'une application d'ET-1 (résultats explicités dans le paragraphe suivant), l'échantillon de cellules observées ne fut pas très important mais toutefois suffisant pour obtenir des résultats exploitables et significatifs. L'évolution des concentrations calciques intracellulaires des SCs a révélé que ces cellules présentent une activité calcique spontanée. Elles développent des oscillations calciques spontanées dont la fréquence de base est se situe vers 0.05Hz.

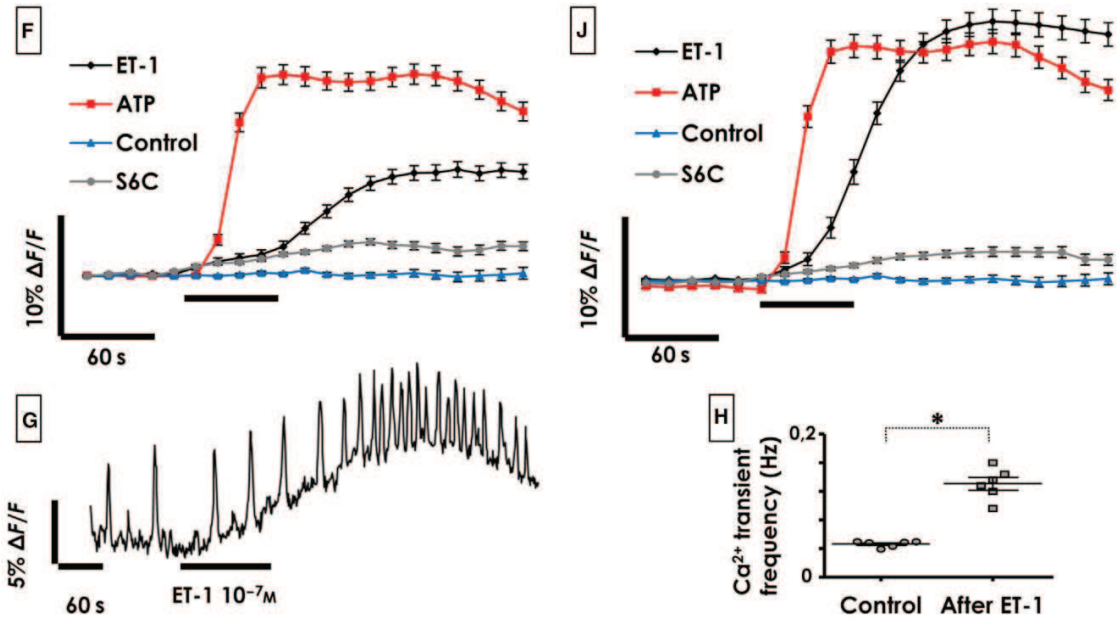


Figure 22b. *Réponses calciques générées par l'ET-1 dans les SCs et les OECs.*

Evolution du signal calcique représenté en ΔF/F. Sur les SCs (**F**) l'application d'ET-1 (10^{-7}M) (barre noire) induit une réponse des cellules importantes mais toutefois plus modeste que la réponse induite par l'ATP (10^{-4}M) (n=52). Sur les OECs (**J**) l'ET-1 et l'ATP induisent des réponses d'intensité équivalente (n=72). Dans les deux cas, la S6C (10^{-7}M) n'induit pas de réponse calcique majeure. En **G**, réponse unitaire d'une SCs à l'application de l'ET-1 : la fréquence des oscillations calciques et le niveau basal calcique de la SCs augmentent à la suite de l'application de l'ET-1. **H** Moyenne des fréquences des oscillations calciques de SCs avant et après application d'ET-1 (n=6). *P ≤ 0.05.

Issue de l'article : Le Bourhis et al., 2014.

L'application d'ET-1 a induit une augmentation nette de la concentration intracellulaire des SCs, à laquelle se superpose une forte augmentation de la fréquence des oscillations calciques, plus que doublée à 0.12Hz. **Figure 22b.** Il n'a pas été possible de réaliser ce type d'analyses sur les cellules engainantes, leur corps cellulaires étant très étirés. Il était donc impossible, dans nos conditions expérimentales, d'individualiser une seule OECs. De plus, elles ne semblaient pas développer d'oscillations clairement visibles à l'œil. L'ensemble de ces résultats nous ont permis d'affirmer que les SCs et les OECs sont activés par l'ET-1. Nous savions que ces cellules répondaient à l'ET-1 *in vitro* (Gouadon *et al.*, 2010) et nous avons confirmé ce résultat *ex vivo*. La question qui se posait donc naturellement ensuite était de vérifier si cette activation par l'ET-1 pouvait entrainer un découplage des jonctions GAP des cellules gliales *ex vivo*, dans le tissu intact tridimensionnel, comme c'était le cas en culture primaire sur des cellules réparties en tapis cellulaire ?

D. Confirmation *ex vivo* des effets découplants de l'ET-1 et CBX

Une des méthodes la plus couramment utilisée pour mettre en évidence une communication GAP-jonctionnelle entre des cellules dans tranche de tissu est de charger une cellule au moyen d'une électrode remplie d'un marqueur capable de traverser les jonctions GAP (lucifer yellow ou biocitine), de laisser diffuser ce marqueur de proche en proche, et de comparer la diffusion entre la situation contrôle et la situation où le tissu est traité avec un agent découplant. J'ai donc successivement utilisé le lucifer yellow et la biocitine pour charger une cellule de soutien patchée. Le lucifer yellow permet de voir la diffusion par fluorescence en imageant en direct, alors que la biocitine nécessite une fixation et la réalisation d'immunohistochimie post hoc. Malheureusement, ces essais ce sont soldés par des échecs, aucune diffusion de ces marqueurs aux cellules voisine n'étant observable. **Figure 23a.**

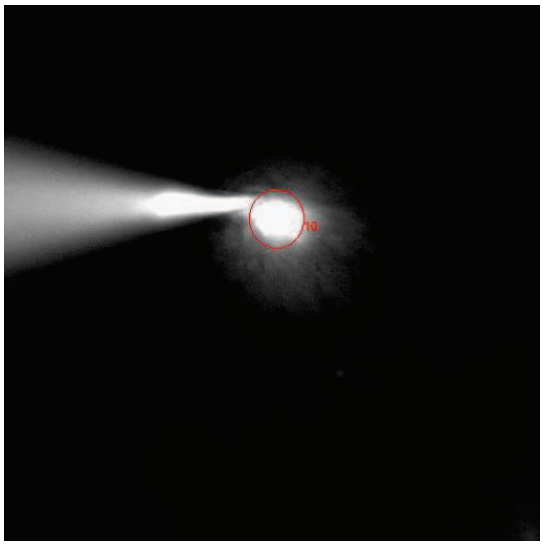


Figure 23a. *Photographie en épifluorecence d'un explant septal de MO.*

Une SCs a été patchée et chargée en lucifer yellow (LY). La SCs est bien chargée mais aucune diffusion du LY n'est visible aux cellules voisines.

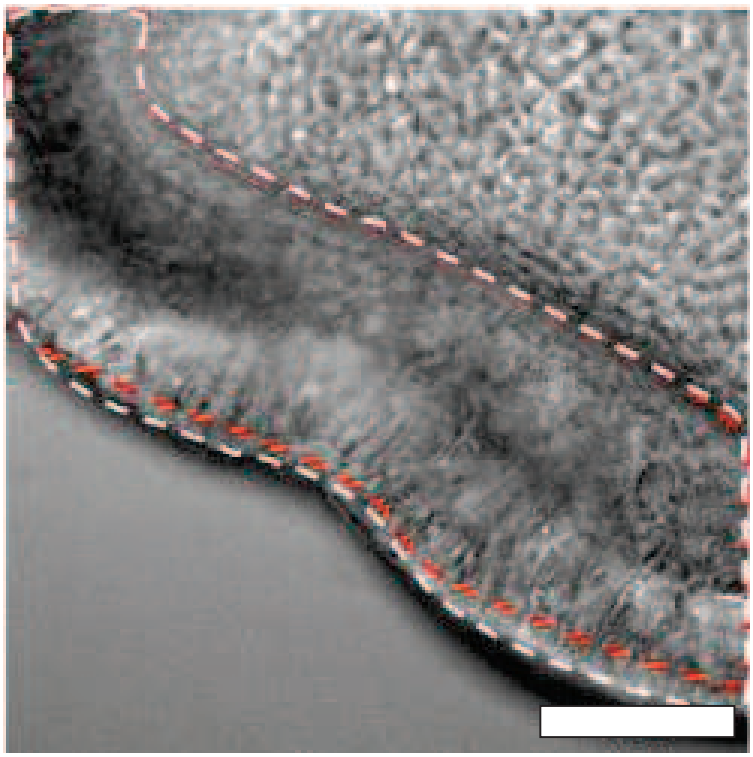


Figure 23b. *L'Et-1 induit une forte contraction de la MO.*

Photographie en contraste inter différentiel d'une tranche de MO. Les pointillés blancs montrent le périmètre de la MO avant l'application de l'ET-1 (10^{-7}M) alors que les pointillés rouges montrent le périmètre de la MO après l'application de l'ET-1. Echelle : 50µm.

Ce résultat rejoint des données précédentes rapportant l'absence de diffusion de lucifer Yellow ou d'Alexa 488 entre cellules de soutiens voisines dans la MO (Vogalis *et al.*, 2005b). Néanmoins, dans cette étude les auteurs démontraient que les SCs étaient bel et bien connectées par des jonctions GAP par des approches de doubles enregistrements en patch-clamp. Dans le contexte de mon travail de thèse, une telle étude de l'effet de l'ET-1 sur les jonctions GAP par patch-clamp en tranche de MO fut rapidement écartée, du fait de la forte contraction induite par l'endothéline dans le tissu olfactif, comme cela avait été décrit dans les tissus utérin (Tanfin *et al.*, 2011), pulmonaire (Gomart *et al.*, 2014). En effet, lors des premières expériences d'imagerie calcique en tranche, une forte contraction de l'ensemble de la MO fut observée en réponse à l'application d'ET-1. En revanche, l'ATP et la S6C n'induisaient pas de contraction notable. **Figure 23c.** Cette contraction de plusieurs µm (**Figure 23b** tracé rouge tracé blanc) ne permettait pas de patcher et d'enregistrer les SCs pendant 20-30 minutes, temps nécessaire pour mesurer l'évolution de la dynamique des jonctions communicantes. Nous avons donc choisi d'adapter l'approche de couplage entre stimulation électrique et imagerie calcique utilisée sur culture primaire, à une préparation d'explant de MO.

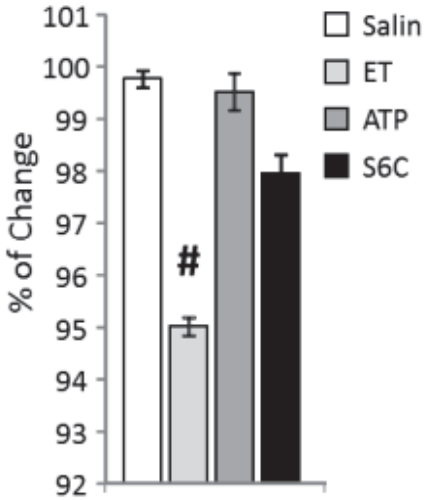


Figure 23c. *Contraction significative de la MO suite à l'application d'ET-1.*

La surface de la MO a été mesurée avant et après application de solution (ET-1 10-7M, ATP 10-5M, S6C 10-7M). La surface après application a été exprimée en % de la surface avant application. Seul l'ET-1 induit une réduction de la surface de la MO significativement différente. # : $P<0.05$ / n = 10.

Des explants de MO septale ont été chargés avec de l'Oregon Green comme pour les tranches de MO. Les septums m'ont permis de visualiser par au-dessus la couche des SCs comme on observe un tapis cellulaire en CP. Sur une zone la plus plane possible, j'ai approché une électrode de stimulation pour effectuer une stimulation électrique d'une cellule de soutien. **Figure 24a.** La réponse a été visualisée et enregistrée grâce au dispositif d'imagerie. J'ai tout d'abord noté que la stimulation électrique d'une cellule de soutien induit, sur explant comme sur CP, la genèse et la propagation d'une vague calcique qui se diffuse de proche en proche de façon circulaire. Il est alors possible de mesurer l'intensité maximale et l'efficacité de propagation de cette vague calcique selon les conditions appliquées. Nous avons donc défini une ROI (1) centrée sur le point de stimulation, et une ROI (2), concentrique mais plus périphérique qui nous ont permis de quantifier la propagation du signal calcique de l'une à l'autre de ces ROIs. **Figure 24b.** Les résultats ont été exprimés en pourcentage de propagation (intensité enregistrée dans la ROI 2 reportée à l'intensité initiale de la ROI 1). Alors que les résultats des explants non traités (Salin) et des explants traités avec de l'ATP (10^{-4}M) ont montré une propagation équivalente à 80%, les résultats des explants traités avec l'ET-1 (10^{-7}M) ou la CBX (10^{-4}M) ont révélé une diminution significative de la propagation : propagation de seulement 40 à 50%. **Figure 24c.**

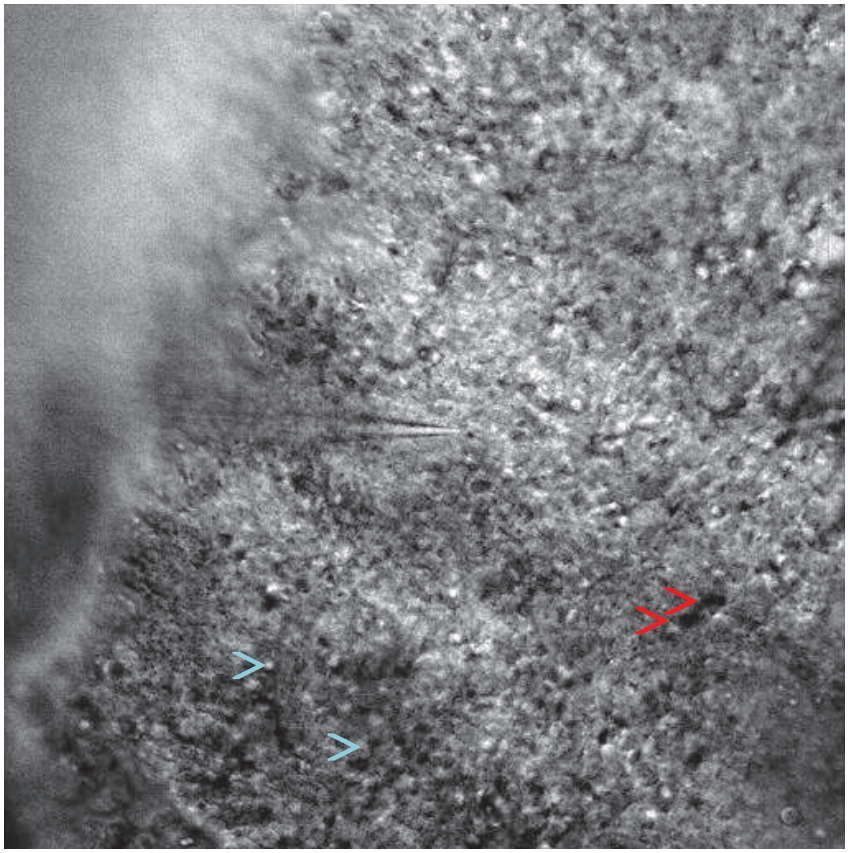


Figure 24a. *Photographie en contraste inter-différentiel d'un explant de MO.*

Les boutons dentritiques des neurones olfactifs (flèches bleues), les SCs et les ouvertures des glandes Bowman sont visibles (flèches rouges). La pipette de stimulation a été placée au centre du champ visuel au contacte des SCs.

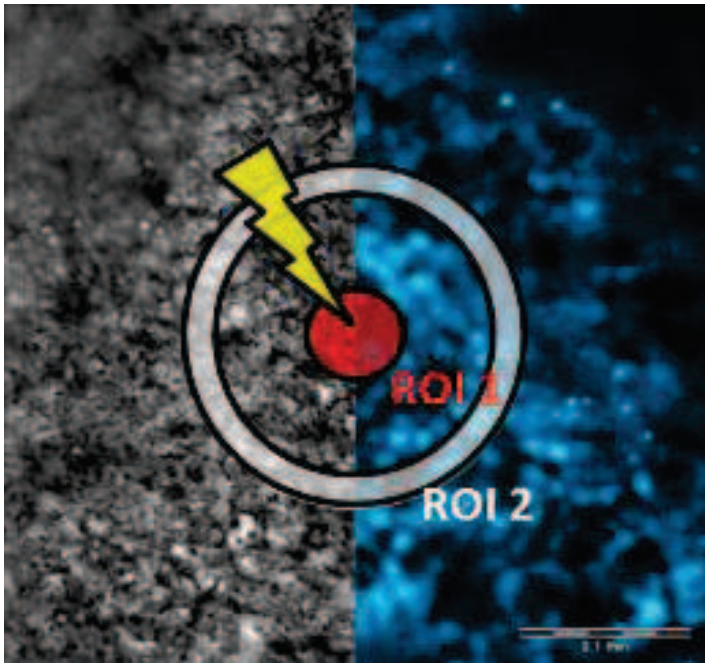


Figure 24b. *A gauche : photo d'un explant de MO en contraste inter-différentiel.*

A droite : le même explant exposé en fluorescence (sonde utilisée : Oregon Green). En surimpression, la localisation de la stimulation électrique au centre (éclair) et les deux ROI utilisées pour étudier la propagation du message calcique généré.

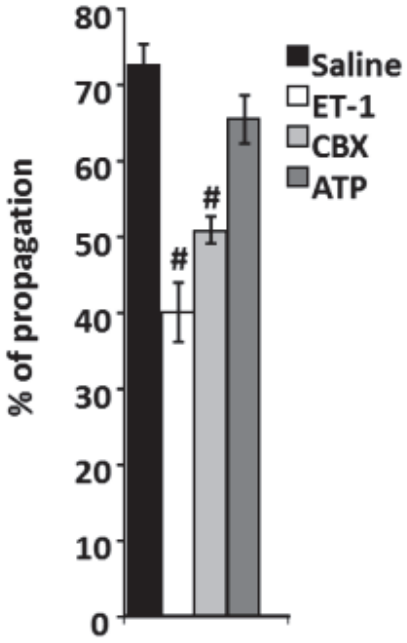


Figure 24c. *L'ET-1 et la CBX réduisent la propagation de vague calcique.*

En condition contrôle (Saline) le pourcentage de propagation entre la ROI1 et la ROI2 est d'environ 70%. L'application d'ATP (10-4M) ne modifie pas cette valeur. Alors que les applications d'ET-1 (10-7M) ou de CBX (10-4M) diminuent drastiquement cette propagation. # : $P<0.05$ / n = 10.

A ce stade de mon travail, mes résultats obtenus par électrophysiologie et imagerie calcique tant *in vitro* et qu'*ex vivo*, ajoutés aux données préliminaires et bibliographiques du laboratoire, démontrent clairement une action de découplage par l'ET-1 des jonctions GAP présentes entre les SCs comme entre les OECs, très similaire à celle opérée par la CBX.

La question suivante était donc d'explorer les conséquences fonctionnelles que cette action de l'endothéline pouvait avoir.

Si l'ET-1 présente clairement des propriétés anti-apoptotiques, mes résultats ne démontraient pas directement d'implication de la modulation des jonctions GAP dans ce phénomène, l'utilisation de la CBX n'ayant effectivement pas permis de confirmer l'action de l'ET-1.

Nous avons donc recherché les effets éventuels que ce phénomène de découplage jonctionnel de cellules non-neuronales par l'endothéline pouvait avoir sur la fonctionnalité principale du tissu olfactif, à savoir la détection des odorants.

E. ET-1 et de la CBX ont des effets modérés sur l'EOG

Il est bien connu que la dynamique des jonctions GAP module l'activité du réseau de cellules gliales et influe également sur l'activité des réseaux neuronaux dans le SNC (Pannasch & Rouach, 2013; Anders *et al.*, 2014; Gomart *et al.*, 2014). La question d'une analogie possible entre le SNC et le fonctionnement de la MO s'est alors posée : les cellules gliales de la MO, et leurs jonctions GAP, peuvent-elles moduler l'activité neuronale au sein de la MO ?

Afin de tester cette hypothèse, l'activité neuronale de la MO en réponse aux stimulations odorantes a été enregistrée par electro-olfactogramme (EOG). L'EOG correspond à un enregistrement électrophysiologique extracellulaire effectué à la surface de l'épithélium olfactif en réponse à un stimulus odorant. La réponse enregistrée équivaut à

un potentiel de champ qui résulte de la sommation des potentiels récepteurs générés par l'activation simultanée de plusieurs neurones situés à proximité de l'électrode d'enregistrement. J'ai enregistré simultanément les réponses électriques des cornets IIB et III résultantes des stimulations odorantes à l'acétate d'isoamyle (AI). Cet odorant est classiquement utilisé car connu pour induire une réponse robuste et reproductible des neurones olfactifs. Une fois que les réponses obtenues étaient bien stables, les réponses à T0 furent prises comme référence. J'ai alors déposé, à l'aide de pipettes, des micro-gouttes de solution sur chaque cornet. Comme indiqué sur la **Figure 25a**, un cornet recevait donc un flux continu de salin et l'autre un flux continu de solution saline dans laquelle était diluée de l'ET-1 (10^{-6}M) ou de la CBX (10^{-4}M). Tout en vérifiant que le flux n'inondait pas le tissu, j'enregistrais l'évolution au cours du temps du signal électrique de chaque cornet. **Figure 25b.** Le traitement local de la MO avec la solution n'a pas affecté de manière significative l'amplitude et ni la cinétique des réponses olfactives induites par l'AI. L'évolution des signaux enregistrés sur le cornet recevant de la solution saline m'a donc servi comme contrôle interne à chaque expérience. L'évolution des amplitudes et cinétiques des réponses enregistrées sur le cornet recevant l'ET-1 ou la CBX fut donc exprimée par rapport à celle des réponses du cornet contrôle.

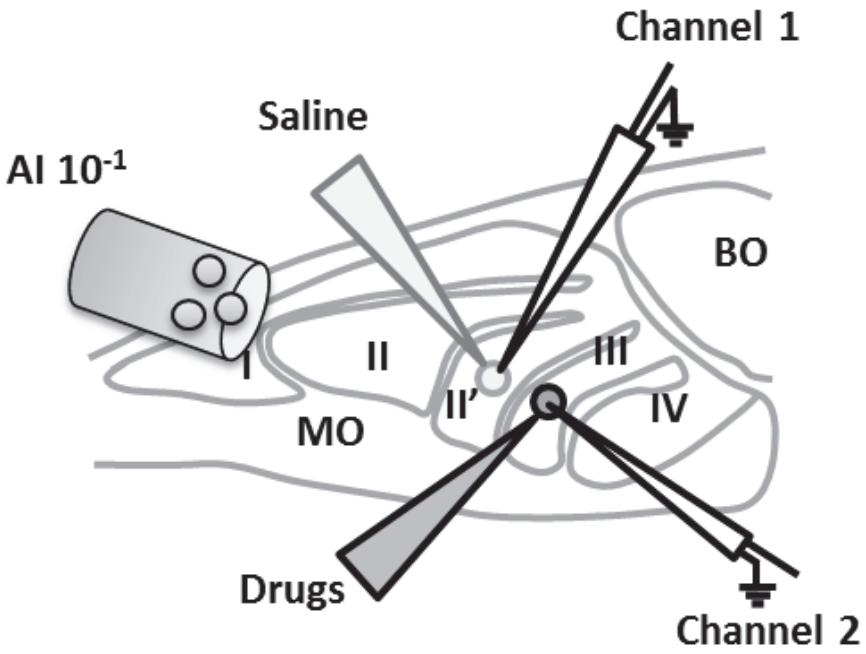


Figure 25a. *Procédure expérimentale de la mise en évidence de l'influence de l'ET-1 et de la CBX sur les réponses olfactives en EOG.*

Sur les cornets II' et III de la MO, deux électrodes d'enregistrements sont représentées (Channel 1 et Channel 2) ainsi que deux électrodes de dépôts. Celle sur le cornet II' permet de déposer une solution saline « mucus » (Saline) alors que celle sur le cornet III permet d'y déposer l'agent pharmacologique d'intérêt comme l'ET-1 ou la CBX (Drugs). Les deux cornets sont enregistrés simultanément à la suite d'une stimulation odorante (AI 1/10 dans l'huile minérale). Le dispositif délivrant l'odorant libère également un flux continue d'air humide sur la préparation pour maintenir l'intégrité du tissu et donc des enregistrements.

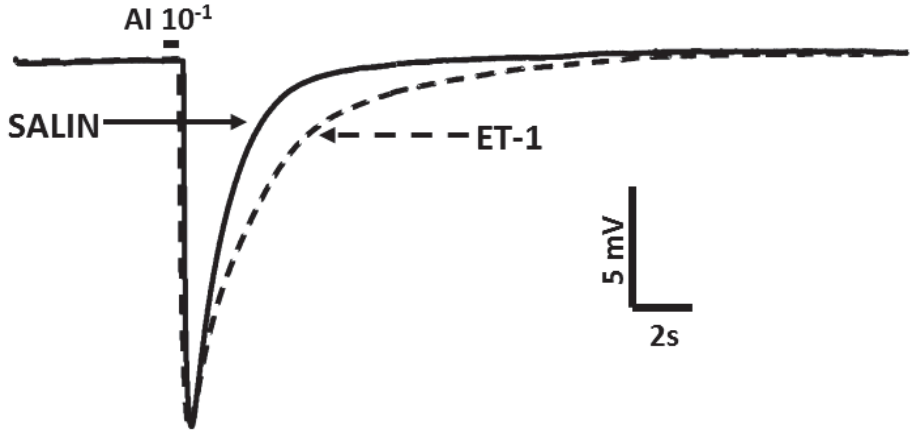


Figure 25b. *Enregistrement moyen pour les conditions Salin et ET-1.*

A 5 minutes après le dépôt d'ET-1 et de salin sur les cornets, les signaux ne présentent pas de différence d'amplitude (environ -15mV) mais on note une différence sur les cinétiques de repolarisation: ici l'ET-1 a induit un ralentissement de repolarisation après la réponse à la stimulation odorante.

Des changements significatifs entre les paramètres des cornets contrôles et des cornets traités ont été observés à partir de 5 minutes d'enregistrement. Bien qu'ils ne semblent pas modifier pas l'amplitude des réponses olfactives de façon significatives, l'ET-1 et la CBX induisent de façon similaire une augmentation significative de la durée de repolarisation de ces réponses. **Figure 25c**. Il ne semblait donc pas que le découplage des jonctions GAP entre cellules gliales de la MO ait un retentissement majeur sur l'amplitude des réponses aux odorants de cette dernière. Néanmoins, l'EOG ne permet d'accéder qu'au niveau le plus périphérique de la réponse olfactive, le potentiel récepteur généré dans les neurones olfactifs par la reconnaissance d'un odorant par son récepteur, et la première étape de transduction de ce signal qui s'ensuit. J'ai donc cherché à vérifier si le changement de cinétique des réponses olfactives et/ou d'autres effets de l'ET-1 au-delà de ce compartiment très périphérique pouvait avoir des conséquences au niveau plus intégré des performances olfactives des animaux.

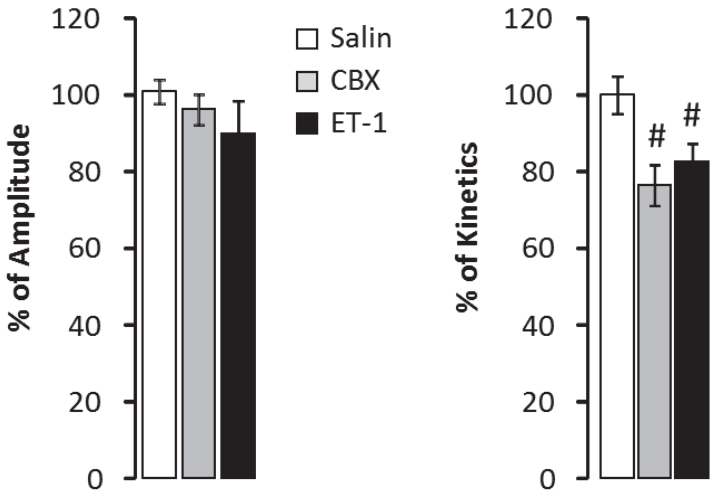


Figure 25c. *L'ET-1 et la CBX modifient les cinétiques de réponses olfactives.*

Les valeurs enregistrées sur les cornets ayant reçu l'application de salin ont été prises pour référence et contrôles internes. Les applications d'ET-1 et de CBX n'ont pas modifié les amplitudes des signaux EOG. Elles ont cependant affecté significativement les cinétiques de repolarisation. # : $P<0.05$ / $n = 6$.

F. ET-1 et CBX affectent les performances olfactives

Afin de vérifier si les petits changements des cinétiques des réponses olfactives observées en EOG pouvaient influer sur le "comportement olfactif" de nos animaux, nous avons soumis de jeunes ratons des tests de choix olfactifs. Agés de dix jours, les ratons n'ont pas encore le sens de la vision alors que leur odorat est déjà efficace. De plus, ils sont très familiers avec l'odeur de leur mère dont la reconnaissance conditionne leur survie. Les ratons testés donc ont été séparés de leur mère, et conservés 45 minutes au chaud, en restriction alimentaire, afin de les motiver à retrouver leur mère. Après 35 minutes, les animaux reçoivent des injections de 10 µL de solution directement dans chaque narine. Les ratons ont pu recevoir selon le groupe auxquels ils appartenaient : aucune injection (Null), du salin (témoin), de l'ET-1 (10^{-6}M), de la CBX (10^{-4}M), des BQ (10^{-5}M), ou des BQ (10^{-5}M) + ET-1 (10^{-6}M). 10 minutes plus tard, les ratons réalisaient le test comportemental. Ils étaient placés dans un labyrinthe en T contenant deux compartiments opposés: l'un contenant de la sciure propre, l'autre contenant de la sciure souillé par leur mère. **Figure 26a.** Nous avons mesuré la vitesse de déplacement et les performances d'orientation des animaux en fonction de la source odorante. Ces paramètres ont été étudiés sur différents groupes de 10 ratons issus d'une même portée : Null vs salin ; salin vs ET-1 (10^{-6}M) ; salin vs CBX (10^{-4}M) ; salin vs BQ (10^{-5}M) ; BQ (10^{-5}M) vs BQ (10^{-5}M) + ET-1 (10^{-6}M), avec chaque fois 5 animaux dans chaque condition de chaque groupe. Les dix animaux d'un groupe ont passé le test le premier jour en recevant une solution, et le lendemain une l'autre solution. Chaque condition comporte alors 10 individus testés. Comme pour l'EOG, nous avions ici un contrôle interne (salin) qui servait de référence. La durée maximale du test a été fixée à 1 minute si l'animal ne trouvait pas la source odorante. Les animaux ont été suivis par videotracking et leur orientation par rapport à la source odorante fut évaluée à chaque instant par la méthode scalaire, le MSPD (mean scalar product difference) (Meunier & Nielsen, 2014). En **Figure 26b** un raton qui n'a pas

trouvé la source odorante pendant la minute, et un raton qui a réussi à retrouver la signature olfactive de sa mère. Sur l'évolution du MSPD en fonction du temps, la différence de profil de ces deux animaux est notable, on voit très bien que les deux animaux scannent l'environnement, le second (tracé bleu, où le test a été arrêté une fois la source odorante atteinte) avec plus de succès que le premier (tracé rouge où les 60 secondes maximales du test lui ont été laissées). **Figure 26c.**

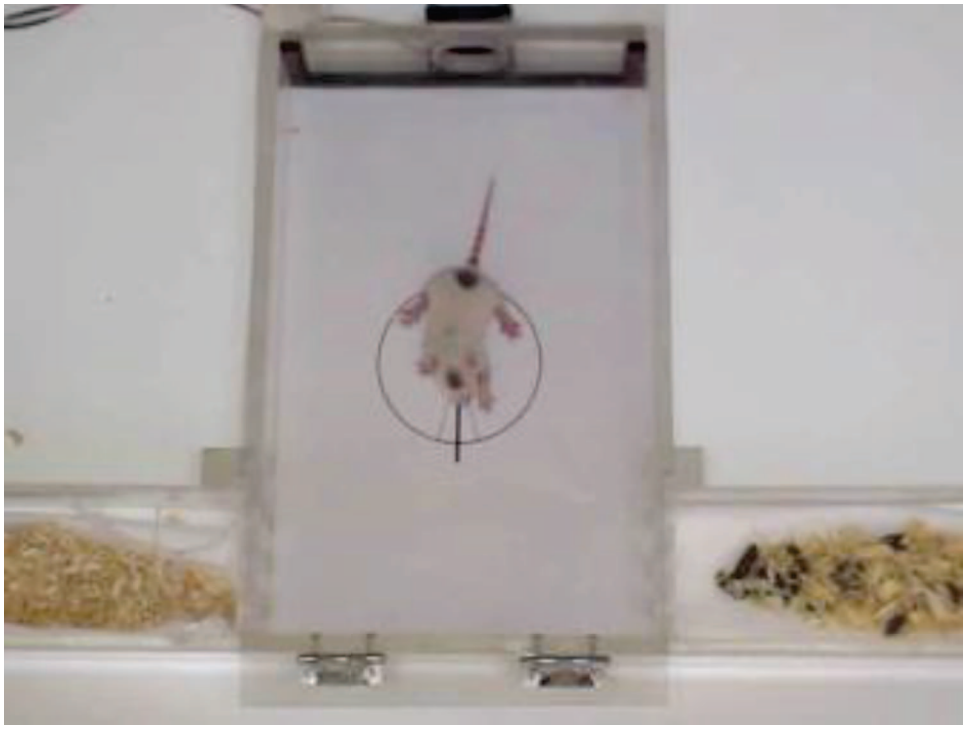


Figure 26a. *Photographie du dispositif de test comportemental.*

Un ventilateur permet l'extraction de l'air (en haut sur la photo), un bras du dispositif contient de la sciure propre (en bas à gauche), l'autre bras contient de la sciure souillée par la mère (en bas à droite). Le raton, marqué à la tête et au bassin pour obtenir ses coordonnées et son orientation lors de ses déplacements, est placé au centre du dispositif. Il a alors 60 secondes pour retrouver l'origine odorante. Agé de 10 jours, les ratons encore aveugles utilisent principalement leur olfaction pour se repérer et s'orienter.

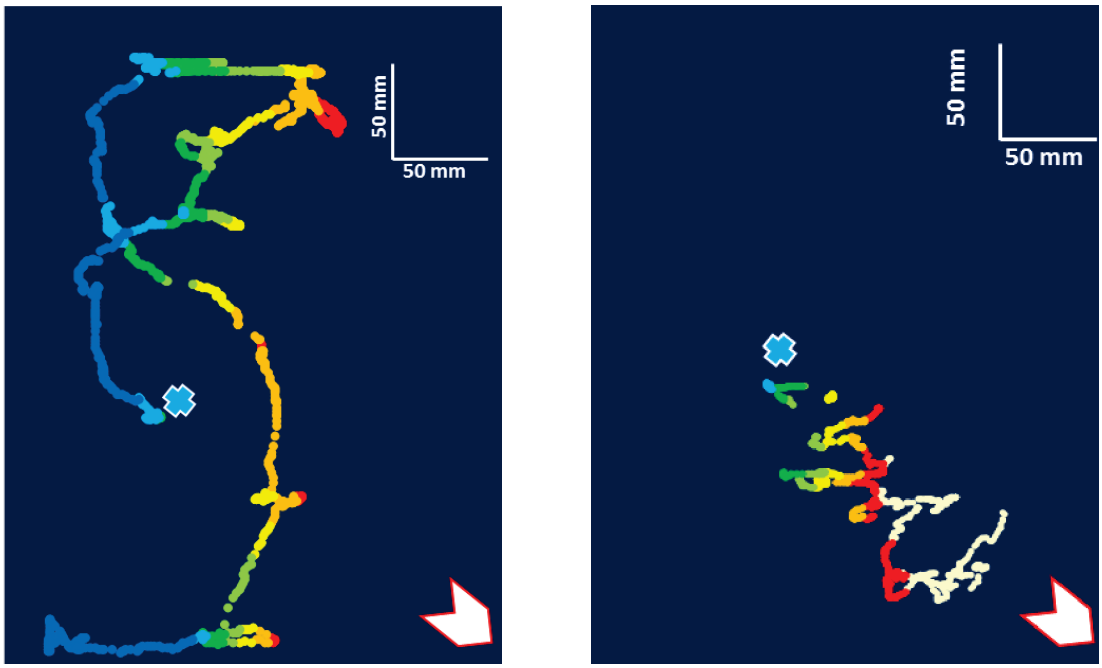


Figure 26b. *Résultats comportementaux de ratons « échec » (à gauche) et « réussite » à droite.*

Chaque point représente une position de l'animal. La couleur du point détermine l'orientation de l'animal en fonction de la source odorante. L'orientation de l'animal a été déterminée par l'axe formé par les marques faites au niveau du bassin et de la tête. Plus la couleur est chaude plus l'animal est bien orienté vers l'odeur de sa mère (bleu > vert > jaune > orange > rouge > blanc). A gauche, le raton a été placé au centre du dispositif (croix bleue) et n'a pas retrouvé la source odorante de sa mère (tête de flèche blanche et rouge). Il a exploré une grande distance et s'est mal orienté la plupart du temps. A droite le raton placé au niveau de la croix bleue s'est bien orienté vers la source odorante (tête de flèche blanche et rouge) et s'est dirigé vers elle. Vidéotracking effectué sous Kinovéa.

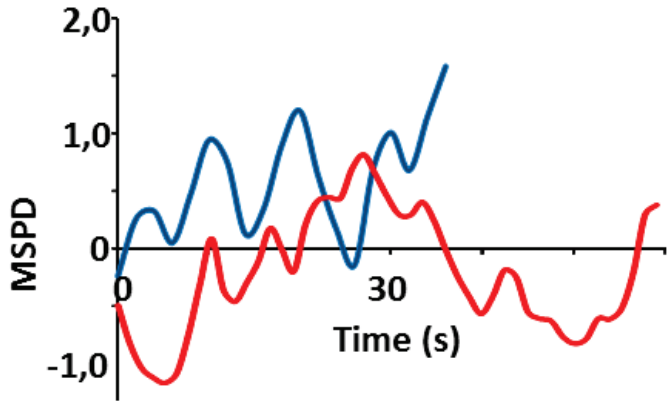


Figure 26c. *Evolution du coefficient d'orientation (MSDP) des animaux en fonction du temps.*

En rouge nous avons le raton « perdu » et bleu nous avons le ratons ayant retrouvé l'origine de la source odorante (Figure 26b). Le raton « bleu » présente un processus d'exploration où il balaye son environnement et se rapproche de plus en plus de la source.

Les résultats ont montré que les animaux du groupe contrôle n'ayant subi aucune injection n'ont pas été plus efficaces que les animaux qui ont reçu la solution saline directement dans la cavité nasale, validant le fait que les injections intranasales neutres n'affectaient pas les performances olfactives des animaux. En revanche, nos résultats ont montré que l'ET-1, comme le CBX, réduit de façon significative les performances olfactives des animaux traités par rapport aux animaux contrôles, dans une proportion relativement importante par rapport à ce que nous attendions compte tenu des résultats d'EOG précédents. Les BQs (antagonistes spécifiques des récepteurs ET-1) seuls n'ont eu aucun effet sur les résultats des animaux, alors qu'associés à l'ET-1, ils ont limité les effets de cette dernière. Enfin, ces tests n'ont pas mis en évidence de différences entre les différents groupes traités et les contrôles en ce qui concerne la distance totale parcourue et la vitesse avec laquelle les petits retrouvaient l'odeur de leur mère. Ce dernier résultat permet d'affirmer que les injections n'avaient pas eu d'effet nocif ou toxique sur les ratons et sur leurs capacités motrices. **Figure 26d.** L'ensemble de ces résultats montrent que les agents de découplage, ET-1 et CBX, altèrent de manière significative les performances olfactives des ratons traités.

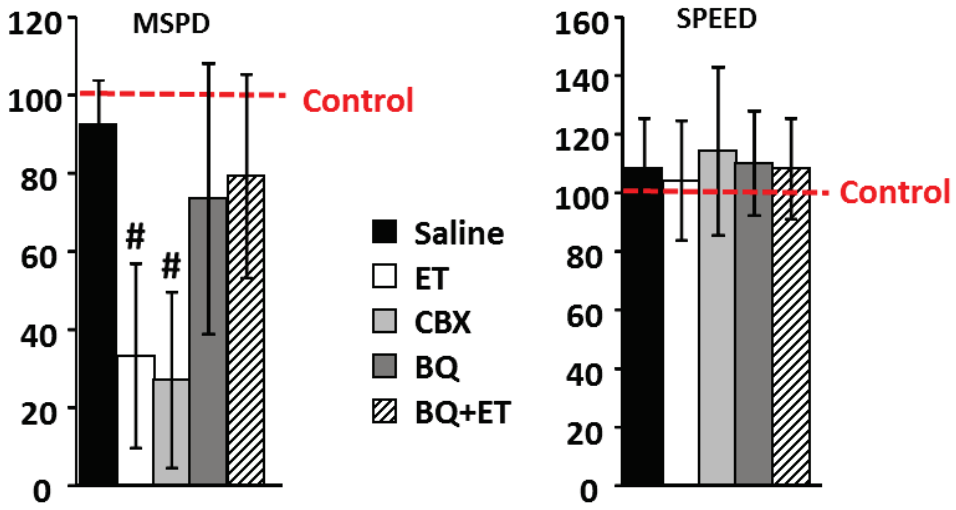


Figure 26d. *L'ET-1 et la CBX perturbent les performances olfactives.*

Le MSPD correspond au coefficient d'orientation et de succès de l'animal pour le test olfactif. La ligne pointillé rouge représente la control interne de chaque condition (aucune injection VS salin ; salin VS ET-1 ; salin VS CBX ; salin VS BQ ; BQ VS ET-1+BQ). La valeur du MSPD est exprimée en % de la valeur du control. Seul l'ET-1 et la CBX ont affecté statistiquement les performances olfactives des ratons testés. L'injection intranasale de solution saline ou des différentes drogues testées ne modifie pas les capacités locomotrices des animaux. La vitesse de déplacement (speed) n'a jamais été affectée quelques soit les conditions (aucune injection VS salin ; salin VS ET-1 ; salin VS CBX ; salin VS BQ ; BQ VS ET-1+BQ). Il n'y eu aucune toxicité de la part des molécules utilisées. # : $P<0.05$ / $n = 10$.

G. Enregistrement des nerfs olfactifs

D'un côté nous avions les effets modestes des découplants des jonctions GAP sur les réponses olfactives enregistrées en EOG, de l'autre nous fûmes surpris par les effets cette fois marqués de ces mêmes molécules sur les capacités olfactives des animaux lors des tests comportementaux. Ce contraste nous laissait croire que l'ET-1 comme la CBX pouvaient agir à un autre niveau, plus en aval de la MO, comme par exemple au niveau des faisceaux d'axones des neurones olfactifs, entourés d'OECs. D'où la question suivante : est-il possible que les cellules gliales, via leur jonction GAP, modulent la transmission du signal électrique entre la MO et le BO ?

Mon idée était donc d'enregistrer et de suivre l'activité électrique des nerfs olfactifs en réponse à une stimulation odorante, en absence puis en présence d'un agent découplant (ET-1 et CBX) déposé sur la MO et/ou le nerf olfactif. Ce design expérimental était un peu osé car aucune donnée bibliographique ne donne d'élément sur l'enregistrement *in vivo* de nerfs olfactifs de rat anesthésié. Cependant, j'avais déjà pratiqué la stéréotaxie, l'anesthésie adéquate pour ce genre d'opération et l'ouverture de fenêtres expérimentales dans le crâne de l'animal, les trois principales techniques requises pour cette mise au point.

Une fois l'animal profondément anesthésié, il fut placé dans un cadre stéréotaxique, pour fixer la tête. Le même dispositif d'application aérienne d'odorant que celui utilisé pour l'EOG fut placé devant ses narines. Un flux d'air humide était continuellement présent, et des stimulations odorantes pouvaient être déclenchées manuellement. Une fois le rat anesthésié et installé sur le cadre stéréotaxique, des fenêtres chirurgicales ont été réalisées, en avant et en arrière de la lame criblée : l'ouverture rostrale permettait l'accès à la MO et le dépôt de solution saline avec ou sans agent découplant, l'ouverture caudale permettait d'introduire des pipettes d'enregistrement pour atteindre les faisceaux d'axones des neurones olfactifs. **Figure 27.**

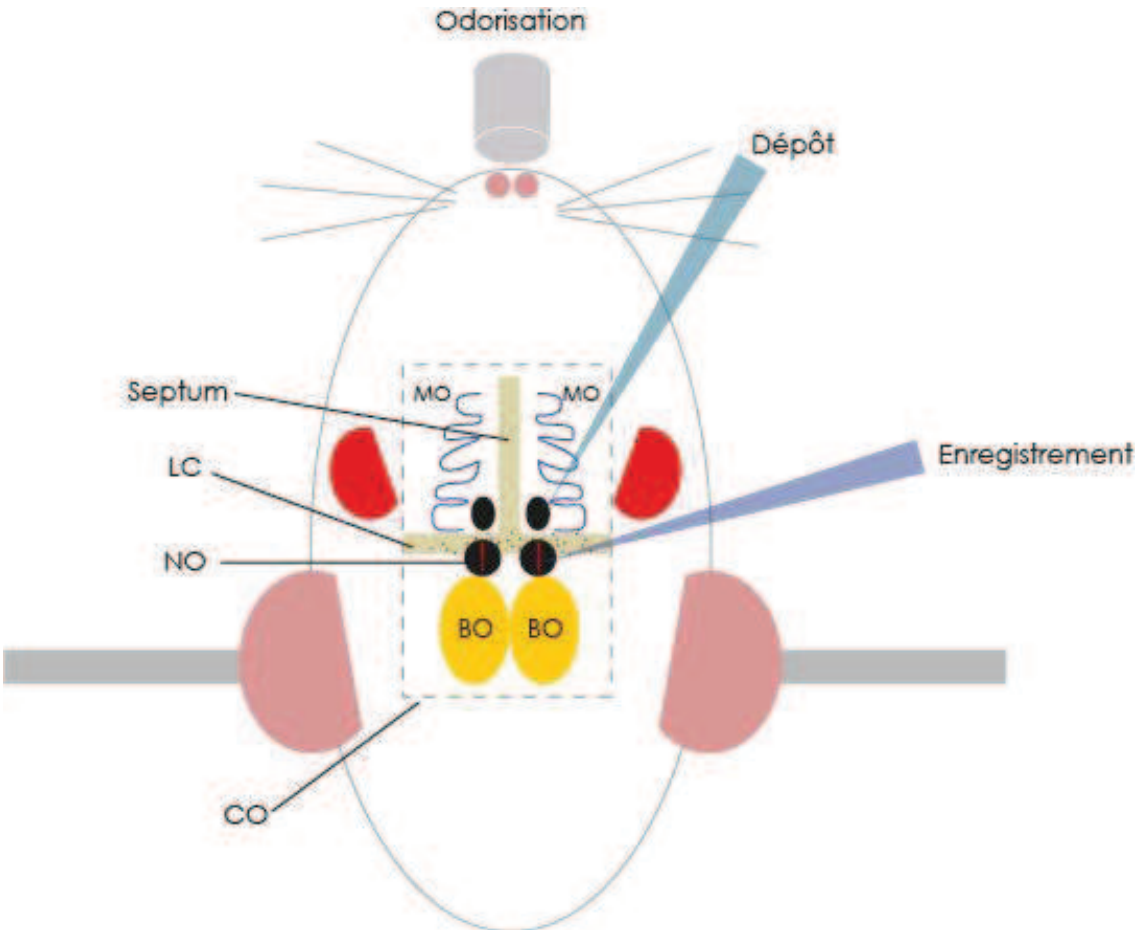


Figure 27. *Schéma du design expérimental pour enregistrer les nerfs olfactifs.*

Un rat anesthésié a été placé dans un cadre de stéréotaxie (barres d'oreilles représentées en gris sur le schéma). La peau du crane et les muscles ont été écartés pour dégager un champ opératoire. L'os du crane a été perforé de part et d'autre de la lame criblée. L'ouverture la plus rostrale a permis le dépôt de solution au niveau des cornets de la MO (solutions saline ou d'agents pharmacologiques ET-1 ou CBX). L'ouverture la plus caudale, entre la lame criblée et le BO, a permis de descendre une électrode d'enregistrement vers les faisceaux de nerfs olfactifs. L'expérience a été prévue pour enregistrer de façon bilatéral afin d'avoir un coté contrôle un coté traité.
Crédit : LNAcody

Le protocole mis au point comprenait des ouvertures bilatérales pour déposer d'un côté de la MO une solution saline contrôle et de l'autre l'agent découplant. Ceci afin d'avoir un contrôle interne comme pour les expériences d'EOG et de comportement. J'espérais enregistrer des fréquences de potentiels d'action émis par les neurones olfactifs de façon basale, puis suite à une stimulation odorante, et voir si l'application de l'ET-1 ou de la CBX modulait ces fréquences de décharge. Malheureusement, sur une dizaine de rats, après plusieurs essais d'orientation, de taille de pipette d'enregistrement, d'angle d'approche, je n'ai jamais obtenu d'enregistrement de potentiels d'action à l'état basal ou suite à une stimulation odorante. Devant les contraintes de temps, nous avons donc décidé de rechercher des effets des agents découplants, l'ET-1 en premier lieu, directement au niveau du BO.

H. Action de l'ET-1 sur les cellules gliales du BO

Devant l'échec des essais d'enregistrement du nerf olfactif, et pour trouver des pistes d'explication au décalage entre le léger effet sur l'EOG et l'effet majeur observé sur les performances olfactives des ratons, nous avons donc décidé d'investiguer les effets que l'ET-1 pouvait induire au niveau du BO.

Nous avons choisi la stratégie appliquée avec succès à la MO : tranches de tissus frais et imagerie calcique. La préparation de tranches de BO demanda quelques mises au point mineures par rapport aux tranches de MO, et nous avons rapidement obtenu des tranches de BO viables et fonctionnelles pour nos expériences. Nous avons utilisé le même fluorophore calcique, l'Oregon Green, qui s'est avéré tout aussi efficace sur les tranches de BO que sur la MO. Au moyen de cette approche par imagerie calcique, nous avons choisi dans un premier temps de nous focaliser sur les cellules engainantes de la couche du nerf olfactif, en périphérie des BO pour deux raisons principales. D'une part parce que nos résultats démontraient des effets robustes de l'ET-1 sur les OECs au niveau de la MO, et d'autre part

parce que ces cellules gliales accompagnent et dialoguent avec les axones des neurones olfactifs (Rieger *et al.*, 2007), qui véhiculent le signal olfactif sous forme de potentiels d'actions, depuis la MO jusqu'au BO. Comme pour la MO, l'ATP a été utilisé comme contrôle positif pour évoquer des réponses calciques cellulaires. L'intensité de fluorescence, exprimée en pourcentage de son niveau de base, a été quantifiée au sein de ROIs correspondants aux corps cellulaires d'OECs localisées dans la couche du nerf olfactif en périphérie du BO. Avant, pendant, et après application d'ET-1 (10^{-7}M) et d'ATP (10^{-5}M).

Comme dans la MO, les OECs répondent par une augmentation de concentration calcique intracellulaire à l'application d'ET-1 et d'ATP. Les profils de réponse à l'ET-1 des OECs dans le BO sont assez similaires à ceux de leurs homologues de la MO : une augmentation assez lente, une forte intensité maximale et un retour à un niveau basal lent et progressif. **Figure 28**. Tandis que leur réponse à l'ATP fut clairement différente de celle obtenue dans la MO : plus transitoire et rapide, avec une intensité maximale plus faible que dans la MO. Ces résultats démontrent que les OECs au niveau la couche du nerf olfactif dans le BO sont sensibles à l'ET-1. En plus d'agir au niveau de la MO, le peptide peut donc avoir une action au niveau central sur le premier relai olfactif qu'est le BO. Ils soulignent également une différence de profil de réponses à différents modulateurs entre les OECs de la MO et du BO. Cette différence semble conforter l'idée de la présence de deux populations légèrement différentes d'OECs dans ces deux structures olfactives. Ces expériences demeurent pour le moment la première et la seule investigation que j'ai pu réaliser au cours de ma thèse des effets des découplants de jonctions GAP dans le BO. Ces données me semblent néanmoins très importantes à approfondir. On peut en effet supposer que l'effet important de l'ET-1 observé dans les expériences de comportement puisse provenir d'une synergie entre un effet modeste dans la MO (changement des cinétiques des réponses olfactives) et d'autres effets non élucidés encore

prenant place entre les nerfs olfactifs et les BO, et impliquant, entre autres, les cellules engainantes.

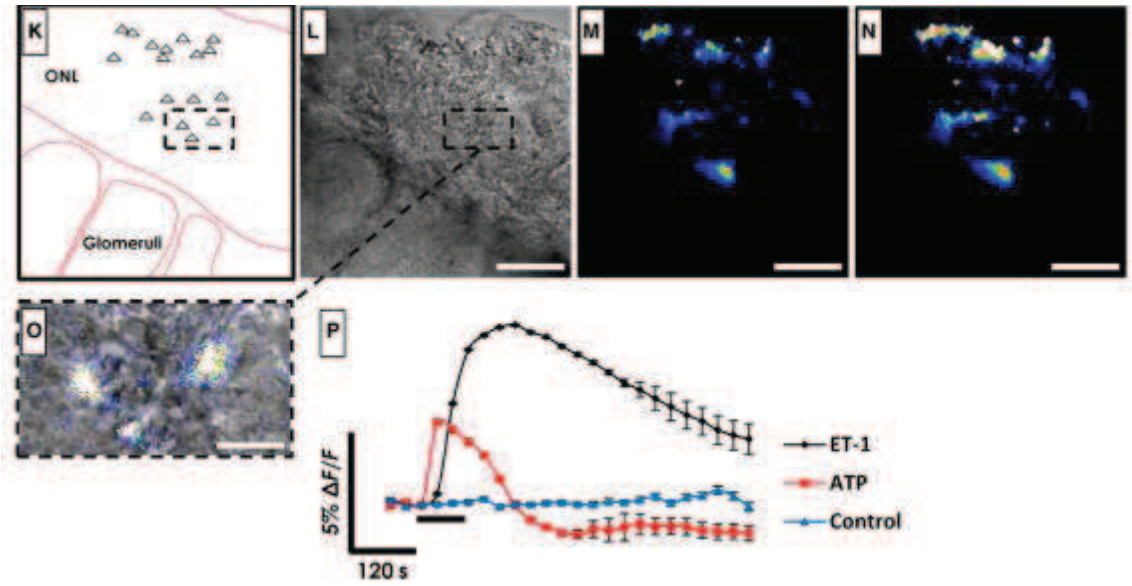


Figure 28. *L'ET-1 active également les OECs de la couche des nerfs olfactifs.*

En K, la représentation schématique de la coupe de bulbe olfactif avec la couche des nerfs olfactifs (ONL) contenant des OECs. Les glomérules sont situés en dessous. En L, M et N la même coupe de BO en photographie à contraste interdifférentiel, et en épifluorescence avant et après application d'ET-1 (10-7M). Echelle : 100µm. En O, un zoom sur les OECs ayant répondu pendant l'application d'ET-1. Echelle : 25µm. En P, les réponses moyennes obtenues dans le BO aux applications d'ET-1 (10-7M) et d'ATP (10-4M) : signal calcique enregistré à partir de ROI contenant des OECs et représenté en ΔF/F. Comme dans la MO, l'ET-1 induit une forte réponse calcique, mais l'ATP induit ici une réponse plus faible que dans la MO. n = 36

IV. Discussion et perspectives:

A. Approches en culture primaire

1. L'ET-1 a-t-elle une action découplante des jonctions GAP au sein de la MO ?

Les résultats d'hybridation *in situ* montrent clairement que l'ET-1 est produite et maturée au sein de la MO. Les diverses expériences menées dans cette thèse ont eu pour objectif de caractériser les fonctions physiologiques de l'ET-1 sur les cellules de ce tissu nerveux.

Parmi les actions pléiotropiques de l'ET-1, le découplage des jonctions GAP des cellules gliales a été décrit dans différentes régions du système nerveux central (Giaume *et al.*, 1992; Blomstrand *et al.*, 2004). Il restait à déterminer si l'ET-1 pouvait agir de la sorte sur les cellules gliales de la MO. Les SCs et les cellules engainantes sont bien décrites pour leurs connexions à travers les jonctions GAP (Vogalis *et al.*, 2005a; Rela *et al.*, 2010). Afin de tester si l'ET-1 pourrait agit également comme un agent découplant sur les jonctions GAP des SCs et des OECs, nous avons choisi de commencer ce travail sur la culture primaire et effectué deux séries d'expériences. Nous avons examiné d'abord la propagation par des jonctions GAP d'une augmentation de calcium intracellulaire générée par une stimulation électrique. Une telle stimulation externe va activer les cellules qui se trouvent autour de l'électrode de stimulation (Murphy *et al.*, 1993) et initier une onde calcique pouvant se propager aux voisines si elles sont couplées électriquement.

Dans notre culture primaire de MO, la propagation des réponses calciques induites électriquement peut être suivie par imagerie calcique. Elles se propagent de manière circulaire à partir de la zone de stimulation. **Figure 18 (Voir Page 57).** La présence de découplant des jonctions GAP classiquement utilisés comme la CBX et le 18a-GA (Meme *et al.*, 2009)

entraine une diminution de cette propagation. **Figure 18 (Voir Page57).** L'application d'ET-1 a eu un effet similaire, alors que l'ATP, qui pourtant active massivement (calcium) les cellules de la MO en culture primaire, ne change en rien cette propagation inter-cellulaire Ces résultats sont cohérents avec une action découplante des jonctions GAP de l'ET-1 sur les cellules gliales de la MO. Cependant quelles cellules sont affectées ? Comme les OECs représentent la majeure partie des cellules de la culture primaire de la MO (Gouadon *et al.*, 2010), cette diminution de propagation de vague calcique par l'ET-1 provient probablement d'une action sur ce type cellulaire.

Nous avons ensuite cherché non seulement à identifier plus clairement le type cellulaire affecté par l'ET-1 mais aussi à montrer par une autre approche l'action découplante de l'ET-1. Nous avons choisi de suivre l'évolution de la résistance membranaire par patch-clamp avec une identification du type cellulaire par immunocytochimie post-hoc. Cette résistance membranaire augmente lors d'un découplage des jonctions GAP en corrélation avec une baisse de la conductivité cellulaire (Blomstrand *et al.*, 2004). En effet, cette résistance membranaire reflète la diffusion de molécules chargées à travers la membrane plasmique et les canaux qui s'y insèrent. La fermeture de canaux, comme les jonctions GAP, entraine donc une augmentation de résistance. Une fois de plus, l'ET-1, comme la CBX et le 18a-GA, a induit une augmentation de la résistance membranaire. **Figure 20d (Voir Page 76).** L'identification par immunocytochimie post-hoc des cellules patchées a permis de montrer que cette action découplante affecte aussi bien les SCs (exprimant la CK18 ; **Figure 20a (Voir Page 72)**) que les OECs (exprimant le marqueur S100- **Figure 20b (Voir Page 73)**). Ces résultats sont donc tout à fait cohérents avec une action découplante des jonctions GAP des cellules gliales de la MO par l'ET-1. De plus, comme cette action découplante est bloquée par un antagoniste des récepteurs ET_A (majoritairement exprimé dans les cellules non-neuronales de la MO), ce récepteur est très probablement impliqué dans cette action découplante.

2. L'action anti-apoptotique de l'ET-1 est-elle médiée par le découplage des jonctions GAP ?

Associée aux résultats obtenus avant mon arrivée dans le laboratoire, mes données accumulées sur les effets de l'ET-1 sur les cellules de la MO en culture primaires montrent que:

- Le système endothéline est produit au sein de la culture primaire (Gouadon *et al.*, 2010),
- L'ET-1 induit des réponses calciques des cellules non neuronales de cette culture primaires (Gouadon *et al.*, 2010),
- L'ET-1 a des effets anti-apoptotiques sur ces cellules (Laziz *et al.*, 2011)
- L'ET-1 comme les agents découplants tel que la CBX, découple les jonctions GAP des cellules gliales de la MO.

L'action neuroprotectrice du découplage des jonctions GAP a été bien décrite dans le système nerveux central, notamment dans le cadre des processus d'apoptose post-ischémiques (Wang *et al.*, 2012). Afin de tester l'hypothèse que l'ET-1 pourrait avoir une action neuroprotectrice en modulant la perméabilité de jonction GAP dans la MO, nous avons repris des expériences permettant de corréler la présence de LDH dans le milieu extracellulaire d'une culture primaire de muqueuse olfactive avec le taux de mort cellulaire (Laziz *et al.*, 2011). La privation de sérum des cellules de culture primaire entraine un stress et une forte augmentation de la mort cellulaire par apoptose. La présence d'ET-1 dans le milieu permet de limiter cette induction de l'apoptose (Laziz *et al.*, 2011). En effet, le taux de mort cellulaire est significativement plus faible quand l'ET-1 est présent dans le milieu de culture. Si cet effet implique la modulation des jonctions GAP, alors les agents découplant des jonctions GAP comme la CBX devraient être également anti-apoptotiques. Nous avons donc comparé des cultures primaires de MO déprivées en sérum et traitées avec de l'ET-1 comme contrôle positif, ou avec différentes concentrations de CBX. À faible dose (10^{-6} et 10^{-5}M ; **Figure 21 (Voir**

Page 79)), nous n'avons pas observé d'effets particuliers de la CBX sur le taux de mort cellulaire induit par la déprivation : de sérum. À concentration plus forte (10^{-4}M), la CBX induit par contre une augmentation du taux de mort cellulaire. Ces résultats pointent donc une absence d'effet du découplage des jonctions GAP pour limiter la mort cellulaire ainsi qu'une action toxique sur le long terme de concentrations importante de CBX. Il est courant dans la littérature d'utiliser la CBX à des concentrations autour de 10^{-4}M pour induire le découplage de ces jonctions (Goncharenko *et al.*, 2014; O'Donnell *et al.*, 2014), concentration que nous avons donc reprise dans notre étude. Or, une étude visant à limiter la mort cellulaire induite dans une co-culture d'astrocytes et de neurones par une excitotoxicité glutamatergique montre que des traitements de la culture avec 25µM de CBX, amplifie cette mort cellulaire au lieu de la limiter (Ozog *et al.*, 2002). Nous n'avons pas observé d'effet neuroprotecteur de la CBX à 10^{-5}M, dose qui même si ne l'avons pas testé directement en patch-clamp devrait être suffisante pour limiter en partie le couplage des GAP. Il est donc peu probable que l'action découplante seule de l'ET-1 puisse suffire à expliquer son action anti-apoptotique. Les mécanismes sous-jacents à cet effet restent donc à élucider. Une piste pourrait être le relargage de dérivées lipidiques tel que les sphingosines phosphorylées (Raymond *et al.*, 2006).

Nous avons parcouru et validé différentes hypothèses sur le modèle de culture primaire de MO. Il nous restait à confirmer ces données *in vivo* ou *ex vivo*. Différents modèles ont été nécessaires pour explorer les effets de l'ET-1 et de la CBX sur la MO. Certains étaient déjà maitrisés au laboratoire, comme l'EOG ou les expériences comportementales basées sur l'orientation et la détection olfactive. Il a fallu toutefois mettre en place de nouveaux modèles qui n'étaient alors pas encore développés. Ce fut le cas pour les tranches et les explants de MO dont les résultats sont discutés ci-après.

B. Validation *ex vivo* des résultats obtenus sur culture primaire

1. Activation des cellules de MO par l'ET-1 *ex vivo*

Le développement de tranches de MO m'a permis de caractériser l'effet de différents messagers dans ce tissu en préservant au maximum sa structure. Nous avons utilisé l'ATP comme contrôle positif de la qualité de nos tranches car ce nucléotide avait déjà été caractérisé comme activateur des OECs et des SCs (Hegg *et al.*, 2009; Thyssen *et al.*, 2013). Comme attendu ces deux types cellulaires ont répondu aux applications d'ATP. Le profil de réponses à l'ATP a été similaire : une augmentation rapide et forte de la concentration interne calcique **Figure 22b (Voir Page 83)**. Nos tranches de MO permettaient donc de valider l'action potentielle d'ET-1 *ex vivo*.

Le suivi de la concentration cytoplasmique en calcium a montré qu'une stimulation à l'ET-1 induit une forte réponse des cellules gliales de la MO, à savoir les SCs et les OECs **Figure 22a (Voir Page 81)**. En parallèle à cette activation massive, il est apparu évident que l'ET-1 induisait une contraction importante de la tranche de MO **Figure 23b**. Ce phénomène peut être lié aux changements de morphologie cellulaire observé en présence d'ET-1 pour les OECs du BO (Vincent *et al.*, 2003) ainsi que dans d'autres tissus (Di Liberto *et al.*, 2003; Tanfin *et al.*, 2011 ; Gomart *et al.*, 2014).

La cinétique de réponse a été différente pour les réponses induites par une application d'ET-1 comparée à celle des réponses à l'ATP. En effet, nous avons pu observer que les cellules gliales de la MO ont mis plus de temps à atteindre le maximum de réponse suite à une stimulation à l'ET-1 qu'avec une stimulation à l'ATP. L'ET-1 induit, à la suite de sa fixation sur les récepteurs ET_A et ET_B, une cascade cellulaire qui implique l'activation de plusieurs acteurs dont la PLC pour aboutir à la libération de calcium intracellulaire (Venance *et al.*, 1997). De même pour l'ATP, les SCs et les OECs semblent n'exprimer que les récepteurs purinergiques P2Y (Rieger *et al.*, 2007; Hegg *et al.*, 2009;

Lohr *et al.*, 2014). Ce récepteur est couplé à une protéine Gq induisant également l'activation de la PLC pour la libération de calcium. Les canaux purinergiques P2X, canaux cationiques qui auraient facilement pu expliquer cette différence, ne semblent pas être impliqués ici. Les récepteurs à l'ET-1 et à l'ATP sont des récepteurs couplés aux protéines Gq, mais une différence intrinsèques des récepteurs à recruter la protéine G (et donc la cascade qui s'en suit) peut expliquer la différence de cinétique observée. La différence peut également résider par les concentrations utilisées, l'ATP (10^{-4}M) a pu agir plus rapidement que l'ET-1 (10^{-7}M). Une concentration plus forte en ET-1 pourrait donner une réponse satisfaisante à cette question. Ce qui au passage, montre que dans le cas de l'ET-1 ce n'est pas l'augmentation du calcium intracellulaire qui ferme les GAP. Différentes éléments sont à souligner sur les OECs d'une part et sur les SCs d'autres parts.

Les OECs sont situés dans les faisceaux d'axones des neurones olfactifs. Ces cellules très étirées ne sont pas visibles individuellement en microscopie optique. C'est donc la zone où elles se trouvent qui a été imagée, une région dans laquelle se trouvent également les axones des neurones olfactifs. Les réponses observées au niveau de cette zone pourraient donc aussi être dues à des réponses calciques localisées dans les somas des neurones qui se propageraient à leurs axones. Cependant, les neurones olfactifs, dont les corps cellulaires étaient clairement identifiables, n'ont que très rarement répondu aux stimulations d'ET-1 (<1%). Les réponses enregistrées dans cette région de la MO ne pouvaient donc provenir que des OECs qui sont donc comme en culture primaire fortement activées par l'ET-1 dans une tranche de MO issue de jeunes ratons.

Contrairement aux OECs, les corps cellulaires des SCs sont facilement identifiables de par leur localisation apicale (Moon *et al.*, 2009). Il a donc été possible de suivre l'évolution des concentrations calciques de SCs individualisées **Figure 22b (Voir Page 83)**. Cependant, il a été difficile de mesurer cette activation sur un grand nombre de SCs individualisé. En effet, l'ET-1 a induit une contraction de la MO sur la plupart des expériences

d'imagerie, modifiant la position des cellules ce qui rend extrêmement difficile le suivi d'activité de cellule unique puisqu'il faut adapter la ROI sur chaque image. Seules les cellules dont les positions ont été inchangées ont été conservées pour une analyse sur cellule unique. Nous avons alors pu constater que ces cellules émettent des oscillations calciques régulières comme les astrocytes du SNC. Ce phénomène avait déjà été décrit précédemment en réponse à l'ATP (Hegg *et al.*, 2009), mais nous avons observé une oscillation basale nettement plus rapide. L'application d'ET-1 a induit sur les SCs non seulement une augmentation globale du niveau de calcium mais aussi une augmentation de la fréquence de ces oscillations **Figure 22b (Voir Page 83).** L'ET-1 a donc eu un rôle activateur sur ces cellules, et l'essentiel des expériences suivantes ont été menées dans le but d'identifier les conséquences fonctionnelles de cette activation.

2. Pharmacologie des récepteurs à l'Endothéline impliqués dans les vagues calciques des cellules non neuronales de la MO

Afin de caractériser les récepteurs impliqués dans les activations par l'ET-1 des SCs et des OECs, nous avions pensé utiliser la lignée de rat Sl /Sl mutée pour le récepteur ET_B (Ehrenreich *et al.*, 1999). Présente au début de ma thèse, cette lignée n'a pas pu être maintenue et ces expériences n'ont pas pu être réalisées. Nous avons donc choisi d'utiliser une approche pharmacologique, et en particulier de tester l'effet d'un agoniste des récepteurs ET_B. L'application de cet agoniste (la Sarafotoxine, S6C) s'est avéré inefficace pour induire des réponses calciques dans les cellules de la MO indiquant que ce récepteur n'est pas le seul responsable des réponses à l'ET-1. Ce résultat est encore une fois cohérent avec l'étude pharmacologique menée sur culture primaire qui avait montré que les cellules non neuronales de la MO en culture primaire répondait principalement par ET_A aux stimulations à l'endothéline (Gouadon *et al.*, 2010).

Ces résultats d'imagerie ne sont cependant pas vraiment cohérents avec les données obtenues avec les *hybridations in situ*. En effet, les cellules qui ont répondu en imagerie calcique à des stimulations à l'ET-1 dans la MO ne sont pas celles qui ont une expression la plus forte des éléments du système endothéline. Ainsi, les cellules gliales (SCs et OECs) ont une expression modérée des récepteurs ET_A et ET_B par comparaison avec les neurones olfactifs **Figure 17 (Voir Page 55).** Pourtant, alors qu'une application d'ET-1 n'induit que très rarement des réponses calciques dans les neurones, les cellules gliales de la MO y répondent très fortement.

Une première explication pourrait être liée au fait que les récepteurs à l'endothéline sont connus pour être facilement désensibilisés (Freedman *et al.*, 1997; Gartner *et al.*, 2013), et nous avons déjà observé *in vitro*, que les cellules de la MO sont désensibilisées jusqu'à 24 heures après une seule stimulation à l'ET-1 (Gouadon *et al.*, 2010). Si une telle désensibilisation existe également pour les récepteurs à l'endothéline dans la MO *in vivo*, nous pouvons supposer que ce phénomène serait plus fort à l'endroit où l'expression de la Big-ET-1 et la ECE est la plus forte, c'est-à-dire au niveau des couches des neurones et des cellules basales, d'après nos expériences d'HIS. Une deuxième raison pourrait être que les récepteurs à l'ET-1 des neurones olfactifs ne sont pas couplés à une cascade de transduction conduisant à une augmentation de calcium intracellulaire, ce qui n'exclurait absolument pas un effet possible de l'ET-1 sur ces neurones. Il existe en effet plusieurs voies de transduction possibles couplées aux récepteurs à l'endothéline dont une activation des MAP kinase (Nelson *et al.*, 2003), de la PKA mais aussi de la PKC ou encore de la protéine kinase II Ca^{2+}/ calmoduline dépendante (Nabhen *et al.*, 2009). Vu le temps de repos des tranches pendant leur préparation et le fait qu'une très grande majorité des neurones n'ont jamais réagi aux stimulations à l'ET-1 sur le nombre de répétitions de cette expérience, cette deuxième hypothèse semble plus probable. Pour aller plus loin il serait intéressant d'aller patcher les neurones olfactifs *ex vivo* pendant une stimulation à l'endothéline. La contraction concomitante à cette

stimulation semble cependant peu compatible avec des enregistrements de patch-clamp. Une autre approche possible, que je n'ai pas eu le temps de développer au cours de ma thèse, serait d'utiliser des fluorophores dont la fluorescence évolue en fonction du potentiel de membrane (Youngentob & Kent, 1995).

3. Découplage des jonctions GAP par l'endothéline *ex vivo*

Pour étudier les effets de l'ET-1 sur le couplage des jonctions GAP des cellules de la MO *ex vivo*, je me suis heurté à plusieurs difficultés expérimentales. Avec les effets de contraction induit pas l'ET-1 sur la MO, comme dans d'autres tissus (Di Liberto *et al.*, 2003; Tanfin *et al.*, 2011 ; Gomart *et al.*, 2014), les techniques de patch-clamp ont été très rapidement écartées comme mentionnés précédemment. Autant le suivi de la résistance de membrane fut aisé *in vitro*, autant en tranche cela fut très compliqué et frustrant. L'expérience idéale pour étudier ce couplage aurait été le double patch entre deux cellules communicantes, mais maintenir un patch était déjà délicat, alors deux simultanément… Une autre solution a dû être trouvée.

Une technique classiquement utilisée pour étudier le couplage cellulaire via jonction GAP est l'injection de molécule fluorescente ou immunodétectable dans une cellule, et l'étude de la diffusion de cette molécule injectée aux cellules voisines, qui est directement corrélée au niveau de couplage jonctionnel (Park *et al.*, 2011). J'ai donc mis au point une dissection d'explant pour pouvoir regarder la diffusion de marqueur sur le tapis cellulaire formé par les SCs. Les différents essais avec le lucifer yellow ou la biocytine n'ont pas permis d'observer de diffusion de ces marqueurs, rejoignant en cela des observations faites sur les SCs de souris (Vogalis *et al.*, 2005a) et de grenouille (Trotier, 1998). Nous avons donc dû écarter également cette méthode pour l'étude de la dynamique des jonctions GAP.

La mise au point d'explant n'a toutefois pas été vaine. L'idée d'adapter sur les explants l'expérience de stimulations électriques réalisées sur les cultures primaires se révéla fructueuse. Sur un explant chargé en sonde calcique, l'approche d'une pipette de stimulation reliée à un générateur électrique permet de dépolariser une cellule de soutien et d'observer la propagation de proche en proche de cette vague calcique générée artificiellement. Sur plusieurs explants, perfusés avec de l'ACSF, de nombreuses stimulations ont été effectuées pour obtenir une valeur de propagation moyenne dans ces conditions contrôles. Des explants traités à l'ET-1, CBX ou ATP ont alors été étudiés selon le même protocole et la valeur de propagation a été comparée à celle de la condition contrôle. Alors que l'ATP n'a pas eu d'effet significatif sur la propagation, l'ET-1 et la CBX ont réduit statistiquement la propagation de la vague calcique générée par la stimulation électrique **Figure 24c (Voir Page 90).** Ces résultats sont venus confirmer les données *in vitro* et bibliographiques sur les effets découplants de l'ET-1 sur les cellules gliales, et plus précisément sur les SCs dans notre contexte.

Quel pourrait être le type de connexine impliquée dans ce couplage ? Il existe plusieurs types de connexine exprimés dans la MO. Au niveau des SCs, il semblerait s'agir des connexines 43 (Miragall et al. 1992, Zhang et al., 2000). L'utilisation de souris Knock-out pour les connexines 43 pourrait donc valider ce résultat. Ce type de modèle pourrait également caractériser ces aspects pour les OECs. Cependant toutes les études réalisées dans cette thèse ont été faites sur un modèle de rat Wistar et il serait nécessaire de confirmer/caractériser les effets de l'ET-1 et de la CBX sur un modèle souris, ce qui n'a jamais été fait. **Figure 29.**

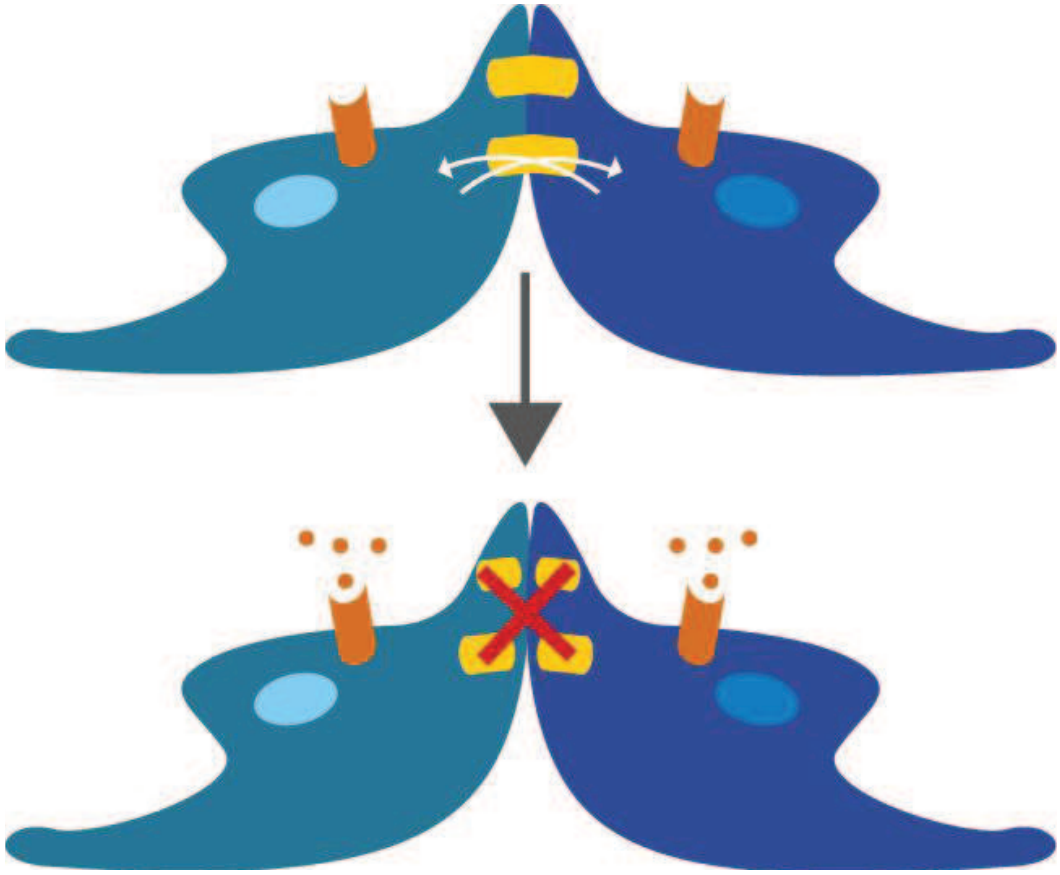


Figure 29. Schéma de l'action de l'ET-1 sur les cellules gliales de la MO.

L'ET-1 en se fixant sur ses récepteurs induit une fermeture des jonctions GAP ce qui entraine des modifications des fonctions olfactives.
Crédit : LNAcody

C. Impact de l'endothéline sur la détection des odorants

1. Evaluation au niveau du potentiel récepteur par Electro Olfactogramme.

Les SCs sont impliquées dans le maintien de l'environnement des neurones (Masukawa *et al.*, 1983; Hansel *et al.*, 2001a; Vogalis *et al.*, 2005a; b; Hegg *et al.*, 2009). La modulation de connectivité par les jonctions GAP pourrait donc indirectement induire des modifications de réponses à une stimulation olfactive. L'ET-1 et la CBX pourrait donc moduler la fonction olfactive en découplant les jonctions GAP des SCs.

La technique d'électro-olfactogramme permet d'évaluer par potentiel de champs, la réponse de dizaine de milliers de neurones à la suite d'une stimulation odorante (Scott & Scott-Johnson, 2002). Nous avons donc mesuré l'évolution de réponses en EOG à des stimulations olfactives répétées en enregistrant simultanément deux zones des cornets olfactifs. L'un des cornets était enregistré en présence de solution saline comme contrôle de modifications spontanées éventuelles du signal et l'autre en présence d'agent découplant (ET-1 ou CBX).

Les deux molécules ont eu un effet significatif sur les signaux enregistrés. Bien que l'amplitude soit restée inchangée, les cinétiques de repolarisation du potentiel suite aux stimulations ont été quant à elles statistiquement plus lentes **Figure 25b (Voir Page 93).** Le fait que l'évolution des amplitudes des réponses olfactives ait été la mêmes sur les cornets contrôles et cornets traités suggère que la voie de transduction activée par les récepteurs n'a pas été modifiée. Ce résultat est cohérent avec une absence d'impact direct sur la détection de l'odorant par les neurones du découplage des jonctions GAP dans les cellules gliales de la MO. Ceci est également cohérent avec les résultats d'imagerie où une application d'ET-1 sur des tranches de MO n'activait quasiment jamais les neurones olfactifs. Si les neurones ne sont pas la cible directe de l'ET-1, alors la modification des cinétiques induites par ces

molécules découplantes des jonctions GAP pourrait s'expliquer par une participation des SCs au maintien de l'homéostasie de l'environnement des neurones olfactifs incluant l'équilibre ionique du mucus, comme discuter dans certaines études (Trotier, 1998; Ghiaroni *et al.*, 2003; Vogalis *et al.*, 2005a). Cette influence est déjà évoquée dans des travaux effectués sur les modulations de l'activité des SCs de la MO de têtards de Xénope (Czesnik *et al.*, 2006). Les gradients ioniques particuliers et particulièrement important pour la physiologie des neurones olfactifs de la MO et leur capacité de réponse aux odorants, pourraient être perturbés par la modification du niveau d'ouverture des jonctions GAP entre les SCs, et donc le fonctionnement de leur réseau. Les effets sur les cinétiques des réponses EOG ont été rapides puisqu'on on observe une modification au bout de quelques minutes après le début de l'application des drogues **Figure 25c (Voir Page 95).** Cette latence d'effet est cohérente avec l'hypothèse d'avoir un temps nécessaire pour la fermeture des jonctions communicantes du réseau.

Durant cette expérience, le protocole de stimulation odorante consistait en des stimulations successives de 200 ms toutes les deux minutes. Il serait intéressant de regarder ce qu'il se passerait vis-à-vis des réponses neuronales si les stimulations odorantes étaient prolongées, de l'ordre de plusieurs secondes : si l'ET-1 et la CBX ont bien agit sur la dynamique de réponse neuronale en modulant les gradients ioniques suite à la perturbation du réseau des SCs, les réponses olfactives à une stimulation longue devraient être d'autant plus affectée. Par manque de temps, nous n'avons pas pu tester cette hypothèse, mais nous avons choisi de tenter de confirmer cet effet au niveau unitaire.

J'ai donc tenté, sur la fin de mon travail de thèse, de patcher des boutons de neurones olfactifs sur explant de MO, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Xavier Grosmaitre à Dijon. Ceci m'aurait permis d'enregistrer les réponses d'un seul neurone et d'observer l'impact sur son environnement généré par l'application d'ET-1 et de CBX. La technique de patch de bouton dendritique de neurone olfactif étant délicate et longue

à maitriser, je n'ai malheureusement pas réussi à obtenir des résultats satisfaisants lors de l'accueil de quelques semaines qui m'a été offert à Dijon. Toutefois le projet de collaboration sur cette technique est toujours en cours pour tenter d'approfondir ces observations.

2. Impact sur l'orientation olfactive de ratons du découplage des jonctions GAP

Quel est l'impact pour l'animal d'un changement des cinétiques de la détection des odorants ? En effet il est difficile d'évaluer l'impact d'une modification du signal EOG sur le message envoyé vers le BO. Afin de le vérifier nous avons utilisé un test comportemental maitrisé au laboratoire. Des ratons de 10 jours sont soumis à une séparation maternelle de 45 min pour les motiver à retrouver leur mère. A cet âge-là, leur vision n'est pas fonctionnelle et seule l'olfaction et l'audition leur permet de se repérer dans l'espace. Les ratons ont donc été placés au centre d'une enceinte avec d'un côté une odeur neutre de litière propre et de l'autre de la litière souillée provenant de la mère, et qui porte donc sa signature olfactive. **Figure 26a (Voir Page 97).** Nous avons alors mesuré l'orientation des ratons vis-à-vis de l'odeur de leur mère ainsi que leur vitesse de déplacement 15 minutes après une injection intranasale de salin ou de drogues. Cette orientation relative est donnée par un score, la moyenne de différence de produit scalaire correspondant à l'orientation préférentielle du raton pour une source odorante (Meunier & Nielsen, 2014). S'il passe son temps orienté vers la source maternelle il aura un score de 2 et de -2 vers la litière propre. Un score de zéro reflète une absence de choix de l'animal. **Figure 26b et Figure 26c (Voir Page 98-99).**

Le fait d'injecter une solution saline prise comme contrôle n'a pas affecté l'efficacité des animaux à retrouver leur mère **Figure 26d (Voir Page 101).** En effet, le score des ratons n'est pas statistiquement différent entre animaux non traités et injectés au salin. De plus ce score situé autour de 1 reflète une bonne détection et motivation pour se diriger vers la source odorante puisque une absence d'orientation se reflète par un score de zéro.

De façon surprenante, la CBX et l'ET-1 ont réduit massivement les scores d'orientation des animaux traités avec des scores se rapprochant de zéro. Ces molécules ont donc très fortement perturbé les capacités olfactives des animaux sans affecter de manière général leur organisme puisque leur vitesse de déplacement n'est quant à elle pas affectée.

En ce qui concerne l'effet de l'endothéline, ce dernier est spécifique puisqu'un co-traitement avec les antagonistes aux récepteurs à l'ET-1 n'a pas eu d'effet seul, mais a par contre bien antagonisé/limité l'effet de l'ET-1.

Il semble peu probable qu'une modulation assez fine de la repolarisation des neurones olfactifs observée en EOG suite au traitement avec des découplants des GAP puisse être seul responsable de l'effet massif observé en comportement. Aurait-on manqué un effet de l'ET-1 et de la CBX dans la MO ?

Il est bien connu que des molécules injectées en intra nasale peuvent agir rapidement dans le système nerveux central, en particulier en remontant le long des nerfs olfactifs (Kristensson & Olsson, 1971; Dhuria *et al.*, 2010; Pardridge, 2012). Il est donc très probable que les découplants affectant la MO agissent également au moins jusqu'au BO. Nous nous sommes donc demandé si une partie de l'effet de l'ET-1 en comportement ne pouvait pas résider dans une action au niveau du BO. De plus, les quantités injectées restent importantes (plus importantes que celles utilisées pour l'EOG), ce qui conforte l'idée du passage de molécules vers le BO.

Nous avons donc utilisé le modèle des tranches de BO couplé à l'approche d'imagerie calcique pour commencer à étudier les effets de l'ET-1, en particulier sur les OECs du BO. Comme dans la MO, les OECs du BO ont répondu à l'ET-1 par une forte réponse calcique. Le BO, et en particulier ses OECs, peut donc être une cible des effets de l'ET-1 sur le système olfactif.

Quel est l'impact de ces découplants des jonctions GAP des OECs qui jalonnent les nerfs olfactifs ? Est-ce que la transmission de l'information olfactive de la MO vers le BO pourrait être elle aussi affectée ?

Il est beaucoup plus complexe d'étudier le découplage des GAP sur des tranches de tissu du notamment à l'effet contractile de l'endothéline et nous n'avons pas pu vérifier *ex vivo* si l'endothéline découple également les jonctions GAP des OECs. Si comme en culture primaire, les découplants des jonctions GAP module l'état du réseau des OECs, cela pourrait affecter la transmission de l'information nerveuse à travers le nerf olfactif ce qui pourrait à son tour affecter le comportement olfactif de l'animal. En effet, l'activité des OECs est modulée par l'influx nerveux, notamment en adaptant l'hémodynamique locale à l'activité nerveuse (Thyssen *et al.*, 2010) et perturber le couplage entre ces cellules pourrait affecter la transmission de l'influx nerveux.

Nous avons tenté d'enregistrer les nerfs olfactifs en travaillant sur un animal en stéréotaxie afin de tester cette hypothèse; malheureusement sans succès.

Si les OECs paraissent clairement sensibles à l'endothéline, la question des effets de l'ET-1 sur ces OECs, entre la MO et le BO, et des conséquences physiologiques sur le signal olfactif intégré au niveau du BO reste donc complètement ouverte.

D. Perspectives expérimentales

Nos résultats nous ont permis de montrer que l'ET-1 avait des actions sur les cellules gliales de la MO au BO. Une des questions non résolue est de savoir si ces actions peuvent modifier les messages olfactifs provenant de la MO en agissant notamment sur les différentes cellules du BO. L'Endothéline est bien connue pour agir sur les astrocytes dans différentes régions du système nerveux central notamment dans l'hippocampe (Bloomstrand et al., 2004) et le striatum (Adermark & Lovinger, 2008). Cette modulation des

fonctions astrocytaires a pour conséquence d'influencer l'activité des réseaux neuronaux connectés *in situ* (Dallerac *et al.*, 2013; Pannasch & Rouach, 2013). Les mécanismes présents dans ces différentes régions cérébrales sont-ils similaires dans la MO et le BO ?

Afin d'y répondre, nous envisageons de stimuler électriquement le nerf olfactif sur des tranches de BO afin de simuler l'arrivée de l'information olfactive provenant de la MO. Cela entrainerait alors la libération du glutamate au niveau des glomérules. Les synapses des cellules mitrales seraient alors excitées et une activité au niveau de la couche des cellules mitrales serait enregistrable par potentiels de champs. Ce type de préparation permettra de mesurer l'impact de la perfusion de l'ET-1 ou la CBX sur l'activité électrique enregistrée.

Une deuxième approche est initiée en collaboration avec le laboratoire de Hirac Gurden afin d'étudier l'impact du découplage des jonctions GAP dans la MO et le BO sur le traitement olfactif *in vivo*. En travaillant sur des animaux adultes implantés dans le BO qui ont appris une tache olfactive de type Go-NoGo, nous pourrons suivre l'impact de l'injection intranasale de découplants des jonctions GAP (dont l'endothéline) non seulement sur le signal électrique enregistré en potentiel de champs dans le BO mais aussi confirmer leur impact sur les capacités olfactives des animaux en comportement. Toutes ces expériences s'intéressant à l'effet de l'ET-1 dans le BO nécessiteront une caractérisation de l'expression des différents composants du système endothéline dans cette région, comme nous l'avons déjà réalisé par HIS dans la MO.

D'autres expériences complémentaires ont été envisagées au cours de ma thèse et non pas été réalisées le plus souvent par manque de temps. L'étude des voies de signalisation initiées par l'activation des récepteurs à l'endothéline pourraient indiquer quels sont les protéines impliquées dans les effets de l'ET-1 dans la MO. L'utilisation d'antagonistes spécifiques lors des expériences de patch-clamp permettrait de déterminer l'implication de tel

ou tel enzyme à la suite de l'activation des récepteurs à l'ET-1. De même, l'utilisation de RT-PCR quantitative sur les différentes cellules de la MO serait sans doute un outil intéressant pour évaluer l'impact au niveau transcriptionnel d'une stimulation à l'ET-1.

Dans les différentes expériences réalisées, une seule dose d'ET-1 ou de CBX a le plus souvent été utilisée. Les concentrations ont été choisies en fonctions des données bibliographiques connues pour avoir un effet physiologique. Toutefois, il serait sans doute intéressant d'étudier l'effet dose de ces molécules sur les expériences d'imagerie calcique ou de patch-clamp par exemple afin de mieux caractériser les effets observés.

Enfin, nous savons que le système endothéline est présent et fonctionnel, au moins dans la MO. L'ET-1 agit à court terme, induit des messages calcique et découple les jonctions GAP, et agit à long terme en étant neuroprotecteur. Replacées dans un contexte totalement physiologique, d'un animal vigile, quel est l'intérêt de ces propriétés pour l'organisme et comment les utilisent-il? Un stress ou une augmentation du flux sanguin pourrait être source d'une activation ponctuelle ? Le rythme circadien pourrait-il réguler une activité constitutive ? L'origine *in vivo* des mécanismes d'activation de ce système, et sa régulation au sein de la MO restent pour le moment encore largement méconnues.

V. Conclusion

Au cours de cette thèse, j'ai pu caractériser les fonctions des cellules de soutien et engainantes de la muqueuse olfactive par l'utilisation de l'endothéline et de la carbenoxolone.

Tout d'abord *in vitro*, j'ai pu montrer, par des techniques d'électrophysiologie, que ces molécules, connues pour être des agents découplants des jonctions GAP dans d'autres tissus, le sont également pour les cellules non neuronales de la muqueuse olfactive. Les cellules de soutien ainsi que les cellules engainantes sont sensibles à ces agents. Ces résultats complètent et précisent ceux obtenus précédemment au laboratoire.

L'objectif principal de ma thèse était la caractérisation *ex vivo* des effets observés *in vitro*. L'utilisation de techniques d'imagerie calcique et d'électrophysiologie sur des préparations physiologiques ont permis de confirmer les effets observés précédemment en culture : l'endothéline active les cellules de soutien et engainantes de la muqueuse olfactive et comme la carbenoxolone, découple les jonctions GAP de ces cellules. Les conséquences sur la fonction olfactive mesurée au niveau de la MO, par EOG se sont révélées toutefois en apparence modestes.

La poursuite de mes recherches *in vivo* a montré un effet important. En comportement, ces molécules ont eu un effet important sur les capacités olfactives des animaux testés. Ces observations ont alors ouvert une porte sur l'investigation des effets de ces molécules dans le bulbe olfactif et les premiers résultats semblent prometteurs.

Par l'utilisation de l'endothéline et de la carbenoxolone, l'ensemble des mes travaux ont permis d'affirmer que les cellules de soutien et les cellules engainantes agissent, au sein de véritables réseaux dans la muqueuse olfactive et jusqu'aux bulbes olfactif, de façon similaire aux cellules gliales du système nerveux. Mes travaux montrent alors un véritable rôle fonctionnel au

sein de ce tissu neuronal périphérique, capable d'influencer le signal neuronal.

VI. References

Adermark, L. & Lovinger, D.M. (2008) Electrophysiological properties and gap junction coupling of striatal astrocytes. *Neurochem Int*, **52**, 1365-1372.

Anders, S., Minge, D., Griemsmann, S., Herde, M.K., Steinhauser, C. & Henneberger, C. (2014) Spatial properties of astrocyte gap junction coupling in the rat hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **369**, 20130600.

Araque, A., Sanzgiri, R.P., Parpura, V. & Haydon, P.G. (1999) Astrocyte-induced modulation of synaptic transmission. *Can J Physiol Pharmacol*, **77**, 699-706.

Asan, E. & Drenckhahn, D. (2005) Immunocytochemical characterization of two types of microvillar cells in rodent olfactory epithelium. *Histochemistry and cell biology*, **123**, 157-168.

Auld, D.S., Colomar, A., Belair, E.L., Castonguay, A., Pinard, A., Rousse, I., Thomas, S. & Robitaille, R. (2003) Modulation of neurotransmission by reciprocal synapse-glial interactions at the neuromuscular junction. *J Neurocytol*, **32**, 1003-1015.

Bagnato, A., Rosano, L., Spinella, F., Di Castro, V., Tecce, R. & Natali, P.G. (2004) Endothelin B receptor blockade inhibits dynamics of cell interactions and communications in melanoma cell progression. *Cancer research*, **64**, 1436-1443.

Barber, P.C. & Lindsay, R.M. (1982) Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience*, **7**, 3077-3090.

Barnett, S.C., Thompson, R.J., Lakatos, A. & Pitts, J. (2001) Gap junctional communication and connexin expression in cultured olfactory ensheathing cells. *J Neurosci Res*, **65**, 520-528.

Beites, C.L., Kawauchi, S., Crocker, C.E. & Calof, A.L. (2005) Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium. *Exp Cell Res*, **306**, 309-316.

Bennett, M.V. (1997) Gap junctions as electrical synapses. *J Neurocytol*, **26**, 349-366.

Bevans, C.G., Kordel, M., Rhee, S.K. & Harris, A.L. (1998) Isoform composition of connexin channels determines selectivity among second messengers and uncharged molecules. *J Biol Chem*, **273**, 2808-2816.

Billig, G.M., Pal, B., Fidzinski, P. & Jentsch, T.J. (2011) Ca2+-activated Cl- currents are dispensable for olfaction. *Nat Neurosci*, **14**, 763-769.

Blomstrand, F. & Giaume, C. (2006) Kinetics of endothelin-induced inhibition and glucose permeability of astrocyte gap junctions. *J Neurosci Res*, **83**, 996-1003.

Blomstrand, F., Giaume, C., Hansson, E. & Ronnback, L. (1999) Distinct pharmacological properties of ET-1 and ET-3 on astroglial gap junctions and Ca(2+) signaling. *Am J Physiol*, **277**, C616-627.

Blomstrand, F., Venance, L., Siren, A.L., Ezan, P., Hanse, E., Glowinski, J., Ehrenreich, H. & Giaume, C. (2004) Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci*, **19**, 1005-1015.

Brechbuhl, J., Klaey, M. & Broillet, M.C. (2008) Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science*, **321**, 1092-1095.

Brechbuhl, J., Moine, F., Klaey, M., Nenniger-Tosato, M., Hurni, N., Sporkert, F., Giroud, C. & Broillet, M.C. (2013) Mouse alarm pheromone shares structural similarity with predator scents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 4762-4767.

Bruzzone, R., White, T.W. & Paul, D.L. (1996) Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *European journal of biochemistry / FEBS*, **238**, 1-27.

Buck, L. & Axel, R. (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, **65**, 175-187.

Caggiano, M., Kauer, J.S. & Hunter, D.D. (1994) Globose basal cells are neuronal progenitors in the olfactory epithelium: a lineage analysis using a replication-incompetent retrovirus. *Neuron*, **13**, 339-352.

Carter, L.A., MacDonald, J.L. & Roskams, A.J. (2004) Olfactory horizontal basal cells demonstrate a conserved multipotent progenitor phenotype. *J Neurosci*, **24**, 5670-5683.

Caspar, D.L., Goodenough, D.A., Makowski, L. & Phillips, W.C. (1977) Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *J Cell Biol*, **74**, 605-628.

Chuah, M.I. & Teague, R. (1999) Basic fibroblast growth factor in the primary olfactory pathway: mitogenic effect on ensheathing cells. *Neuroscience*, **88**, 1043-1050.

Chuah, M.I. & West, A.K. (2002) Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc Res Tech*, **58**, 216-227.

Clozel, M., Loffler, B.M., Breu, V., Hilfiger, L., Maire, J.P. & Butscha, B. (1993) Downregulation of endothelin receptors by autocrine production of endothelin-1. *Am J Physiol*, **265**, C188-192.

Czesnik, D., Kuduz, J., Schild, D. & Manzini, I. (2006) ATP activates both receptor and sustentacular supporting cells in the olfactory epithelium of Xenopus laevis tadpoles. *Eur J Neurosci*, **23**, 119-128.

Czesnik, D., Schild, D., Kuduz, J. & Manzini, I. (2007) Cannabinoid action in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2967-2972.

Dagli, M.L. & Hernandez-Blazquez, F.J. (2007) Roles of gap junctions and connexins in non-neoplastic pathological processes in which cell proliferation is involved. *J Membr Biol*, **218**, 79-91.

Dallerac, G., Chever, O. & Rouach, N. (2013) How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology. *Frontiers in cellular neuroscience*, **7**, 159.

De Maio, A., Vega, V.L. & Contreras, J.E. (2002) Gap junctions, homeostasis, and injury. *Journal of cellular physiology*, **191**, 269-282.

Dhuria, S.V., Hanson, L.R. & Frey, W.H., 2nd (2010) Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci*, **99**, 1654-1673.

Di Liberto, G., Dallot, E., Eude-Le Parco, I., Cabrol, D., Ferre, F. & Breuiller-Fouche, M. (2003) A critical role for PKC zeta in endothelin-1-induced uterine contractions at the end of pregnancy. *Am J Physiol Cell Physiol*, **285**, C599-607.

Dong, F., Zhang, X., Wold, L.E., Ren, Q., Zhang, Z. & Ren, J. (2005) Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. *Br J Pharmacol*, **145**, 323-333.

Doucette, J.R. (1984) The glial cells in the nerve fiber layer of the rat olfactory bulb. *Anat Rec*, **210**, 385-391.

Duan, X., Block, E., Li, Z., Connelly, T., Zhang, J., Huang, Z., Su, X., Pan, Y., Wu, L., Chi, Q., Thomas, S., Zhang, S., Ma, M., Matsunami, H., Chen, G.Q. & Zhuang, H. (2012) Crucial role of copper in detection of metal-coordinating odorants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 3492-3497.

Egidy, G., Juillerat-Jeanneret, L., Jeannin, J.F., Korth, P., Bosman, F.T. & Pinet, F. (2000) Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *Am J Pathol*, **157**, 1863-1874.

Ehrenreich, H., Anderson, R.W., Fox, C.H., Rieckmann, P., Hoffman, G.S., Travis, W.D., Coligan, J.E., Kehrl, J.H. & Fauci, A.S. (1990) Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *The Journal of experimental medicine*, **172**, 1741-1748.

Ehrenreich, H., Kehrl, J.H., Anderson, R.W., Rieckmann, P., Vitkovic, L., Coligan, J.E. & Fauci, A.S. (1991) A vasoactive peptide, endothelin-3, is produced by and specifically binds to primary astrocytes. *Brain Res*, **538**, 54-58.

Ehrenreich, H., Oldenburg, J., Hasselblatt, M., Herms, J., Dembowski, C., Loffler, B.M., Bruck, W., Kamrowski-Kruck, H., Gall, S., Siren, A.L. & Schilling, L. (1999) Endothelin B receptor-deficient rats as a subtraction model to study the cerebral endothelin system. *Neuroscience*, **91**, 1067-1075.

Ekberg, J.A. & St John, J.A. (2014) Crucial roles for olfactory ensheathing cells and olfactory mucosal cells in the repair of damaged neural tracts. *Anat Rec (Hoboken)*, **297**, 121-128.

Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hulser, D.F. & Willecke, K. (1995) Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *J Cell Biol*, **129**, 805-817.

Elsaesser, R., Montani, G., Tirindelli, R. & Paysan, J. (2005) Phosphatidyl-inositide signalling proteins in a novel class of sensory cells in the mammalian olfactory epithelium. *Eur J Neurosci*, **21**, 2692-2700.

Esser, A.T., Smith, K.C., Weaver, J.C. & Levin, M. (2006) Mathematical model of morphogen electrophoresis through gap junctions. *Dev Dyn*, **235**, 2144-2159.

Fabbrini, M.S., Vitale, A., Pedrazzini, E., Nitti, G., Zamai, M., Tamburin, M., Caiolfa, V.R., Patrono, C. & Benatti, L. (1993) In vivo expression of mutant preproendothelins: hierarchy of processing events but no strict requirement of Trp-Val at the processing site. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3923-3927.

Filosa, J.A., Naskar, K., Perfume, G., Iddings, J.A., Biancardi, V.C., Vatta, M.S. & Stern, J.E. (2012) Endothelin-mediated calcium responses in supraoptic nucleus astrocytes influence magnocellular neurosecretory firing activity. *J Neuroendocrinol*, **24**, 378-392.

Francois, A., Laziz, I., Rimbaud, S., Grebert, D., Durieux, D., Pajot-Augy, E. & Meunier, N. (2013) Early survival factor deprivation in the olfactory epithelium enhances activity-driven survival. *Frontiers in cellular neuroscience*, **7**, 271.

Freedman, N.J., Ament, A.S., Oppermann, M., Stoffel, R.H., Exum, S.T. & Lefkowitz, R.J. (1997) Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem*, **272**, 17734-17743.

Furshpan, E.J. & Potter, D.D. (1957) Mechanism of nerve-impulse transmission at a crayfish synapse. *Nature*, **180**, 342-343.

Furshpan, E.J. & Potter, D.D. (1959) Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J Physiol*, **145**, 289-325.

Gadea, A., Schinelli, S. & Gallo, V. (2008) Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci*, **28**, 2394-2408.

Gartner, F., Seidel, T., Schulz, U., Gummert, J. & Milting, H. (2013) Desensitization and internalization of endothelin receptor A: impact of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*, **288**, 32138-32148.

Gasser, H.S. (1956) Olfactory nerve fibers. *J Gen Physiol*, **39**, 473-496.

Getchell, M.L. & Getchell, T.V. (1992) Fine structural aspects of secretion and extrinsic innervation in the olfactory mucosa. *Microsc Res Tech*, **23**, 111-127.

Ghiaroni, V., Fieni, F., Tirindelli, R., Pietra, P. & Bigiani, A. (2003) Ion conductances in supporting cells isolated from the mouse vomeronasal organ. *J Neurophysiol*, **89**, 118-127.

Giaid, A., Gibson, S.J., Ibrahim, B.N., Legon, S., Bloom, S.R., Yanagisawa, M., Masaki, T., Varndell, I.M. & Polak, J.M. (1989) Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7634-7638.

Giaume, C., Cordier, J. & Glowinski, J. (1992) Endothelins Inhibit Junctional Permeability in Cultured Mouse Astrocytes. *Eur J Neurosci*, **4**, 877-881.

Giaume, C. & McCarthy, K.D. (1996) Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci*, **19**, 319-325.

Goldberg, G.S., Valiunas, V. & Brink, P.R. (2004) Selective permeability of gap junction channels. *Biochimica et biophysica acta*, **1662**, 96-101.

Goldstein, B.J. & Schwob, J.E. (1996) Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells. *J Neurosci*, **16**, 4005-4016.

Gomart, S., Damoiseaux, C., Jespers, P., Makanga, M., Labranche, N., Pochet, S., Michaux, C., Berkenboom, G., Naeije, R., McEntee, K. & Dewachter, L. (2014) Pulmonary vasoreactivity in spontaneously hypertensive rats--effects of endothelin-1 and leptin. *Respiratory research*, **15**, 12.

Goncharenko, K., Eftekharpour, E., Velumian, A.A., Carlen, P.L. & Fehlings, M.G. (2014) Changes in gap junction expression and function following ischemic injury of spinal cord white matter. *J Neurophysiol*, **112**, 2067-2075.

Gouadon, E., Meunier, N., Grebert, D., Durieux, D., Baly, C., Salesse, R., Caillol, M. & Congar, P. (2010) Endothelin evokes distinct calcium transients in neuronal and non-neuronal cells of rat olfactory mucosa primary cultures. *Neuroscience*, **165**, 584-600.

Grosmaitre, X., Santarelli, L.C., Tan, J., Luo, M. & Ma, M. (2007) Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. *Nat Neurosci*, **10**, 348-354.

Haga-Yamanaka, S., Ma, L., He, J., Qiu, Q., Lavis, L.D., Looger, L.L. & Yu, C.R. (2014) Integrated action of pheromone signals in promoting courtship behavior in male mice. *Elife (Cambridge)*, **3**, e03025.

Hansel, D.E., Eipper, B.A. & Ronnett, G.V. (2001a) Neuropeptide Y functions as a neuroproliferative factor. *Nature*, **410**, 940-944.

Hansel, D.E., Eipper, B.A. & Ronnett, G.V. (2001b) Regulation of olfactory neurogenesis by amidated neuropeptides. *J Neurosci Res*, **66**, 1-7.

Harkema, J.R., Carey, S.A. & Wagner, J.G. (2006) The nose revisited: a brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicol Pathol*, **34**, 252-269.

Hasselblatt, M., Bunte, M., Dringen, R., Tabernero, A., Medina, J.M., Giaume, C., Siren, A.L. & Ehrenreich, H. (2003) Effect of endothelin-1 on astrocytic protein content. *Glia*, **42**, 390-397.

Hegg, C.C., Greenwood, D., Huang, W., Han, P. & Lucero, M.T. (2003) Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. *J Neurosci*, **23**, 8291-8301.

Hegg, C.C., Irwin, M. & Lucero, M.T. (2009) Calcium store-mediated signaling in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *Glia*, **57**, 634-644.

Hegg, C.C. & Lucero, M.T. (2004) Dopamine reduces odor- and elevated-K(+)-induced calcium responses in mouse olfactory receptor neurons in situ. *J Neurophysiol*, **91**, 1492-1499.

Herve, J.C. & Dhein, S. (2006) Pharmacology of cardiovascular gap junctions. *Advances in cardiology*, **42**, 107-131.

Heydel, J.M., Coelho, A., Thiebaud, N., Legendre, A., Le Bon, A.M., Faure, P., Neiers, F., Artur, Y., Golebiowski, J. & Briand, L. (2013) Odorant-binding proteins and xenobiotic metabolizing enzymes: implications in olfactory perireceptor events. *Anat Rec (Hoboken)*, **296**, 1333-1345.

Hoang, D., Macarthur, H., Gardner, A. & Westfall, T.C. (2002) Endothelin-induced modulation of neuropeptide Y and norepinephrine release from the rat mesenteric bed. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **283**, H1523-1530.

Holy, T.E., Dulac, C. & Meister, M. (2000) Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science*, **289**, 1569-1572.

Huang, Z.H., Wang, Y., Cao, L., Su, Z.D., Zhu, Y.L., Chen, Y.Z., Yuan, X.B. & He, C. (2008) Migratory properties of cultured olfactory ensheathing cells by single-cell migration assay. *Cell research*, **18**, 479-490.

Hynynen, M.M. & Khalil, R.A. (2006) The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent patents on cardiovascular drug discovery*, **1**, 95-108.

Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K. & Masaki, T. (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2863-2867.

Isogai, Y., Si, S., Pont-Lezica, L., Tan, T., Kapoor, V., Murthy, V.N. & Dulac, C. (2011) Molecular organization of vomeronasal chemoreception. *Nature*, **478**, 241-245.

Itoh, Y., Yanagisawa, M., Ohkubo, S., Kimura, C., Kosaka, T., Inoue, A., Ishida, N., Mitsui, Y., Onda, H., Fujino, M. & et al. (1988) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding the precursor of a human endothelium-derived vasoconstrictor peptide, endothelin: identity of human and porcine endothelin. *FEBS Lett*, **231**, 440-444.

Jani, H.R. & Raisman, G. (2004) Ensheathing cell cultures from the olfactory bulb and mucosa. *Glia*, **47**, 130-137.

Janzer, R.C. & Raff, M.C. (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature*, **325**, 253-257.

Jia, C. & Hegg, C.C. (2010) NPY mediates ATP-induced neuroproliferation in adult mouse olfactory epithelium. *Neurobiol Dis*, **38**, 405-413.

Jia, C., Sangsiri, S., Belock, B., Iqbal, T.R., Pestka, J.J. & Hegg, C.C. (2011) ATP mediates neuroprotective and neuroproliferative effects in mouse olfactory epithelium following exposure to satratoxin G in vitro and in vivo. *Toxicol Sci*, **124**, 169-178.

Kanekar, S., Jia, C. & Hegg, C.C. (2009) Purinergic receptor activation evokes neurotrophic factor neuropeptide Y release from neonatal mouse olfactory epithelial slices. *J Neurosci Res*, **87**, 1424-1434.

Karne, S., Jayawickreme, C.K. & Lerner, M.R. (1993) Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from Xenopus laevis dermal melanophores. *J Biol Chem*, **268**, 19126-19133.

Kater, S.B. & Galvin, N.J. (1978) Physiological and morphological evidence for coupling in mouse salivary gland acinar cells. *J Cell Biol*, **79**, 20-26.

Kondo, K., Suzukawa, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Kanaya, K., Ushio, M., Yamaguchi, T., Nibu, K., Kaga, K. & Yamasoba, T. (2010) Age-related changes in cell dynamics of the postnatal mouse olfactory neuroepithelium: cell proliferation, neuronal differentiation, and cell death. *J Comp Neurol*, **518**, 1962-1975.

Koyama, Y., Tsujikawa, K., Matsuda, T. & Baba, A. (2005) Endothelin increases expression of exon III- and exon IV-containing brain-derived neurotrophic factor transcripts in cultured astrocytes and rat brain. *J Neurosci Res*, **80**, 809-816.

Kristensson, K. & Olsson, Y. (1971) Uptake of exogenous proteins in mouse olfactory cells. *Acta neuropathologica*, **19**, 145-154.

Kumar, C., Mwangi, V., Nuthulaganti, P., Wu, H.L., Pullen, M., Brun, K., Aiyar, H., Morris, R.A., Naughton, R. & Nambi, P. (1994) Cloning and characterization of a novel endothelin receptor from Xenopus heart. *J Biol Chem*, **269**, 13414-13420.

Kumar, C.S., Nuthulaganti, P., Pullen, M. & Nambi, P. (1993) Novel endothelin receptors in the follicular membranes of Xenopus laevis oocytes mediate calcium responses by signal transduction through gap junctions. *Mol Pharmacol*, **44**, 153-157.

Kurihara, H., Yoshizumi, M., Sugiyama, T., Takaku, F., Yanagisawa, M., Masaki, T., Hamaoki, M., Kato, H. & Yazaki, Y. (1989) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of endothelin mRNA by vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **159**, 1435-1440.

Kuwaki, T., Kurihara, H., Cao, W.H., Kurihara, Y., Unekawa, M., Yazaki, Y. & Kumada, M. (1997) Physiological role of brain endothelin in the central autonomic control: from neuron to knockout mouse. *Prog Neurobiol*, **51**, 545-579.

Lacroix, M.C., Badonnel, K., Meunier, N., Tan, F., Schlegel-Le Poupon, C., Durieux, D., Monnerie, R., Baly, C., Congar, P., Salesse, R. & Caillol, M. (2008) Expression of insulin system in the olfactory epithelium: first approaches to its role and regulation. *J Neuroendocrinol*, **20**, 1176-1190.

Laird, D.W. (2006) Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*, **394**, 527-543.

Lampe, P.D. & Lau, A.F. (2004) The effects of connexin phosphorylation on gap junctional communication. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 1171-1186.

Lauf, U., Giepmans, B.N., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.C. & Falk, M.M. (2002) Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 10446-10451.

Laziz, I., Larbi, A., Grebert, D., Sautel, M., Congar, P., Lacroix, M.C., Salesse, R. & Meunier, N. (2011) Endothelin as a neuroprotective factor in the olfactory epithelium. *Neuroscience*, **172**, 20-29.

Leinders-Zufall, T., Cockerham, R.E., Michalakis, S., Biel, M., Garbers, D.L., Reed, R.R., Zufall, F. & Munger, S.D. (2007) Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 14507-14512.

Leinders-Zufall, T., Ishii, T., Chamero, P., Hendrix, P., Oboti, L., Schmid, A., Kircher, S., Pyrski, M., Akiyoshi, S., Khan, M., Vaes, E., Zufall, F. & Mombaerts, P. (2014) A family of nonclassical class I MHC genes contributes to ultrasensitive chemodetection by mouse vomeronasal sensory neurons. *J Neurosci*, **34**, 5121-5133.

Levasseur, G., Baly, C., Grebert, D., Durieux, D., Salesse, R. & Caillol, M. (2004) Anatomical and functional evidence for a role of arginine-vasopressin (AVP) in rat olfactory epithelium cells. *Eur J Neurosci*, **20**, 658-670.

Li, Y., Li, D. & Raisman, G. (2005) Interaction of olfactory ensheathing cells with astrocytes may be the key to repair of tract injuries in the spinal cord: the 'pathway hypothesis'. *J Neurocytol*, **34**, 343-351.

Liberles, S.D. & Buck, L.B. (2006) A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium. *Nature*, **442**, 645-650.

Liu, C.Y., Fraser, S.E. & Koos, D.S. (2009) Grueneberg ganglion olfactory subsystem employs a cGMP signaling pathway. *J Comp Neurol*, **516**, 36-48.

Loewenstein, W.R. & Rose, B. (1992) The cell-cell channel in the control of growth. *Seminars in cell biology*, **3**, 59-79.

Lohr, C. & Deitmer, J.W. (2006) Calcium signaling in invertebrate glial cells. *Glia*, **54**, 642-649.

Lohr, C., Grosche, A., Reichenbach, A. & Hirnet, D. (2014) Purinergic neuron-glia interactions in sensory systems. *Pflugers Arch*.

Lohr, C., Thyssen, A. & Hirnet, D. (2011) Extrasynaptic neuron-glia communication: The how and why. *Communicative & integrative biology*, **4**, 109-111.

Lucero, M.T. (2013) Peripheral modulation of smell: fact or fiction? *Seminars in cell & developmental biology*, **24**, 58-70.

MacCumber, M.W., Ross, C.A., Glaser, B.M. & Snyder, S.H. (1989) Endothelin: visualization of mRNAs by in situ hybridization provides evidence for local action. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7285-7289.

Mackay-Sima, A. & Chuahb, M.I. (2000) Neurotrophic factors in the primary olfactory pathway. *Prog Neurobiol*, **62**, 527-559.

Maggi, M., Barni, T., Fantoni, G., Mancina, R., Pupilli, C., Luconi, M., Crescioli, C., Serio, M. & Vannelli, G.B. (2000) Expression and biological effects of endothelin-1 in human gonadotropin-releasing hormone-secreting neurons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, **85**, 1658-1665.

Mainland, J.D., Lundstrom, J.N., Reisert, J. & Lowe, G. (2014) From molecule to mind: an integrative perspective on odor intensity. *Trends Neurosci*.

Makowski, L., Caspar, D.L., Phillips, W.C. & Goodenough, D.A. (1977) Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *J Cell Biol*, **74**, 629-645.

Malnic, B., Hirono, J., Sato, T. & Buck, L.B. (1999) Combinatorial receptor codes for odors. *Cell*, **96**, 713-723.

Mamasuew, K., Hofmann, N., Kretzschmann, V., Biel, M., Yang, R.B., Breer, H. & Fleischer, J. (2011) Chemo- and thermosensory responsiveness of Grueneberg ganglion neurons relies on cyclic guanosine monophosphate signaling elements. *Neuro-Signals*, **19**, 198-209.

Mangahas, C.R., dela Cruz, G.V., Friedman-Jimenez, G. & Jamal, S. (2005) Endothelin-1 induces CXCL1 and CXCL8 secretion in human melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology*, **125**, 307-311.

Masaki, T. (2004) Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 219-224.

Masukawa, L.M., Kauer, J.S. & Shepherd, G.M. (1983) Intracellular recordings from two cell types in an in vitro preparation of the salamander olfactory epithelium. *Neurosci Lett*, **35**, 59-64.

Matthews, H.R. & Reisert, J. (2003) Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction and adaptation. *Curr Opin Neurobiol*, **13**, 469-475.

Mazzuca, M.Q. & Khalil, R.A. (2012) Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochemical pharmacology*, **84**, 147-162.

Meda, P. (1996a) Gap junction involvement in secretion: the pancreas experience. *Clinical and experimental pharmacology & physiology*, **23**, 1053-1057.

Meda, P. (1996b) The role of gap junction membrane channels in secretion and hormonal action. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **28**, 369-377.

Meme, W., Vandecasteele, M., Giaume, C. & Venance, L. (2009) Electrical coupling between hippocampal astrocytes in rat brain slices. *Neurosci Res*, **63**, 236-243.

Menco, B. & Morrison, E. (2003) *Morphology of the mammalian olfactory epithelium: Form, Fine structure and pathology*.

Meunier, N. & Nielsen, B.L. (2014) Using scalar products to refine the interpretative value of an orientation choice test. *Chem Senses*, **39**, 551-560.

Minami, M., Kimura, M., Iwamoto, N. & Arai, H. (1995) Endothelin-1-like immunoreactivity in cerebral cortex of Alzheimer-type dementia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, **19**, 509-513.

Miragall, F., Hwang, T.K., Traub, O., Hertzberg, E.L. & Dermietzel, R. (1992) Expression of connexins in the developing olfactory system of the mouse. *J Comp Neurol*, **325**, 359-378.

Mombaerts, P., Wang, F., Dulac, C., Chao, S.K., Nemes, A., Mendelsohn, M., Edmondson, J. & Axel, R. (1996) Visualizing an olfactory sensory map. *Cell*, **87**, 675-686.

Moon, C., Liu, B.Q., Kim, S.Y., Kim, E.J., Park, Y.J., Yoo, J.Y., Han, H.S., Bae, Y.C. & Ronnett, G.V. (2009) Leukemia inhibitory factor promotes olfactory sensory neuronal survival via phosphoinositide 3-kinase pathway activation and Bcl-2. *J Neurosci Res*, **87**, 1098-1106.

Mucignat-Caretta, C. (2010) The rodent accessory olfactory system. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, **196**, 767-777.

Muller, H.W., Junghans, U. & Kappler, J. (1995) Astroglial neurotrophic and neurite-promoting factors. *Pharmacology & therapeutics*, **65**, 1-18.

Munger, S.D., Leinders-Zufall, T. & Zufall, F. (2009) Subsystem organization of the mammalian sense of smell. *Annual review of physiology*, **71**, 115-140.

Murphy, T.H., Blatter, L.A., Wier, W.G. & Baraban, J.M. (1993) Rapid communication between neurons and astrocytes in primary cortical cultures. *J Neurosci*, **13**, 2672-2679.

Musil, L.S. & Goodenough, D.A. (1991) Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol*, **115**, 1357-1374.

Nabhen, S.L., Guil, M.J., Saffioti, N., Morales, V.P., Bianciotti, L.G. & Vatta, M.S. (2013) Calcium-dependent mechanisms involved in the modulation of tyrosine hydroxylase by endothelins in the olfactory bulb of normotensive rats. *Neurochem Int*, **62**, 389-398.

Nabhen, S.L., Perfume, G., Battistone, M.A., Rossi, A., Abramoff, T., Bianciotti, L.G. & Vatta, M.S. (2009) Short-term effects of endothelins on tyrosine hydroxylase activity and expression in the olfactory bulb of normotensive rats. *Neurochem Res*, **34**, 953-963.

Nagy, J.I., Dudek, F.E. & Rash, J.E. (2004) Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, **47**, 191-215.

Naidoo, V., Naidoo, S., Mahabeer, R. & Raidoo, D.M. (2004) Cellular distribution of the endothelin system in the human brain. *Journal of chemical neuroanatomy*, **27**, 87-98.

Nakajima, M., Tsuruta, M., Mori, H., Nishikawa, C., Okuyama, S. & Furukawa, Y. (2013) A comparative study of axon-surrounding cells in the two nasal nerve tracts from mouse olfactory epithelium and vomeronasal organ. *Brain Res*, **1503**, 16-23.

Negroni, J., Meunier, N., Monnerie, R., Salesse, R., Baly, C., Caillol, M. & Congar, P. (2012) Neuropeptide y enhances olfactory mucosa responses to odorant in hungry rats. *PLoS One*, **7**, e45266.

Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B. & Nisen, P. (2003) The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nature reviews. Cancer*, **3**, 110-116.

Newman, M.P., Feron, F. & Mackay-Sim, A. (2000) Growth factor regulation of neurogenesis in adult olfactory epithelium. *Neuroscience*, **99**, 343-350.

Nilsson, D., Wackenfors, A., Gustafsson, L., Ugander, M., Paulsson, P., Ingemansson, R., Edvinsson, L. & Malmsjo, M. (2008) Endothelin receptor-mediated vasodilatation: effects of organ culture. *European journal of pharmacology*, **579**, 233-240.

Nitsche, J.M., Chang, H.C., Weber, P.A. & Nicholson, B.J. (2004) A transient diffusion model yields unitary gap junctional permeabilities from images of cell-to-cell fluorescent dye transfer between Xenopus oocytes. *Biophys J*, **86**, 2058-2077.

O'Donnell, J.J., 3rd, Birukova, A.A., Beyer, E.C. & Birukov, K.G. (2014) Gap junction protein connexin43 exacerbates lung vascular permeability. *PLoS One*, **9**, e100931.

Ohta, Y. & Ichimura, K. (2001) Globosal basal cells are identified as proliferating cells in mouse olfactory epithelium. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, **110**, 53-55.

Okazawa, M., Shiraki, T., Ninomiya, H., Kobayashi, S. & Masaki, T. (1998) Endothelin-induced apoptosis of A375 human melanoma cells. *J Biol Chem*, **273**, 12584-12592.

Ostrow, L.W. & Sachs, F. (2005) Mechanosensation and endothelin in astrocytes--hypothetical roles in CNS pathophysiology. *Brain Res Brain Res Rev*, **48**, 488-508.

Ozog, M.A., Siushansian, R. & Naus, C.C. (2002) Blocked gap junctional coupling increases glutamate-induced neurotoxicity in neuron-astrocyte co-cultures. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **61**, 132-141.

Pack, A.K. & Pawson, L.J. (2010) Neuroglial modulation in peripheral sensory systems. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, **16**, 342-348.

Pannasch, U., Freche, D., Dallerac, G., Ghezali, G., Escartin, C., Ezan, P., Cohen-Salmon, M., Benchenane, K., Abudara, V., Dufour, A., Lubke, J.H., Deglon, N., Knott, G., Holcman, D. & Rouach, N. (2014) Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nat Neurosci*, **17**, 549-558.

Pannasch, U. & Rouach, N. (2013) Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends Neurosci*, **36**, 405-417.

Pardridge, W.M. (2012) Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **32**, 1959-1972.

Park, W.M., Wang, Y., Park, S., Denisova, J.V., Fontes, J.D. & Belousov, A.B. (2011) Interplay of chemical neurotransmitters regulates developmental increase in electrical synapses. *J Neurosci*, **31**, 5909-5920.

Pataramekin, P.P. & Meisami, E. (2005) Cytochrome oxidase staining reveals functionally important activity bands in the olfactory epithelium of newborn rat. *J Neurocytol*, **34**, 257-268.

Penn, R.D. (1966) Ionic communication between liver cells. *J Cell Biol*, **29**, 171-174.

Pflug, B.R., Zheng, H., Udan, M.S., D'Antonio, J.M., Marshall, F.F., Brooks, J.D. & Nelson, J.B. (2007) Endothelin-1 promotes cell survival in renal cell carcinoma through the ET(A) receptor. *Cancer letters*, **246**, 139-148.

Pittman, Q.J. (2006) Endothelin-an emerging role in proinflammatory pathways in brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290**, R162-163.

Pixley, S.K., Farbman, A.I. & Menco, B.P. (1997) Monoclonal antibody marker for olfactory sustentacular cell microvilli. *Anat Rec*, **248**, 307-321.

Polontchouk, L., Ebelt, B., Jackels, M. & Dhein, S. (2002) Chronic effects of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *FASEB J*, **16**, 87-89.

Ramon-Cueto, A. & Avila, J. (1998) Olfactory ensheathing glia: properties and function. *Brain Res Bull*, **46**, 175-187.

Ransom, B., Behar, T. & Nedergaard, M. (2003) New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci*, **26**, 520-522.

Raymond, M.N., Bole-Feysot, C., Banno, Y., Tanfin, Z. & Robin, P. (2006) Endothelin-1 inhibits apoptosis through a sphingosine kinase 1-dependent mechanism in uterine leiomyoma ELT3 cells. *Endocrinology*, **147**, 5873-5882.

Raymond, M.N., Robin, P., De Zen, F., Vilain, G. & Tanfin, Z. (2009) Differential endothelin receptor expression and function in rat myometrial cells and leiomyoma ELT3 cells. *Endocrinology*, **150**, 4766-4776.

Rela, L., Bordey, A. & Greer, C.A. (2010) Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia*, **58**, 665-678.

Ressler, K.J., Sullivan, S.L. & Buck, L.B. (1993) A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium. *Cell*, **73**, 597-609.

Richter, M., Westendorf, K. & Roskams, A.J. (2008) Culturing olfactory ensheathing cells from the mouse olfactory epithelium. *Methods Mol Biol*, **438**, 95-102.

Rieger, A., Deitmer, J.W. & Lohr, C. (2007) Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia*, **55**, 352-359.

Risek, B., Guthrie, S., Kumar, N. & Gilula, N.B. (1990) Modulation of gap junction transcript and protein expression during pregnancy in the rat. *J Cell Biol*, **110**, 269-282.

Robertson, J.D., Bodenheimer, T.S. & Stage, D.E. (1963) The Ultrastructure of Mauthner Cell Synapses and Nodes in Goldfish Brains. *J Cell Biol*, **19**, 159-199.

Rubanyi, G.M. & Polokoff, M.A. (1994) Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, **46**, 325-415.

Russell, F.D. & Davenport, A.P. (1999) Secretory pathways in endothelin synthesis. *Br J Pharmacol*, **126**, 391-398.

Sakurai, T., Yanagisawa, M. & Masaki, T. (1992) Molecular characterization of endothelin receptors. *Trends Pharmacol Sci*, **13**, 103-108.

Sakurai, T., Yanagisawa, M., Takuwa, Y., Miyazaki, H., Kimura, S., Goto, K. & Masaki, T. (1990) Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature*, **348**, 732-735.

Satoh, M. & Yoshida, T. (2000) Expression of neural properties in olfactory cytokeratin-positive basal cell line. *Brain research. Developmental brain research*, **121**, 219-222.

Schinelli, S. (2006) Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview. *Curr Med Chem*, **13**, 627-638.

Schinelli, S., Zanassi, P., Paolillo, M., Wang, H., Feliciello, A. & Gallo, V. (2001) Stimulation of endothelin B receptors in astrocytes induces cAMP response element-binding protein phosphorylation and c-fos expression via multiple mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Neurosci*, **21**, 8842-8853.

Schmid, A., Pyrski, M., Biel, M., Leinders-Zufall, T. & Zufall, F. (2010) Grueneberg ganglion neurons are finely tuned cold sensors. *J Neurosci*, **30**, 7563-7568.

Schwob, J.E. (2002) Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat Rec*, **269**, 33-49.

Scott, J.W. & Scott-Johnson, P.E. (2002) The electroolfactogram: a review of its history and uses. *Microsc Res Tech*, **58**, 152-160.

Segretain, D. & Falk, M.M. (2004) Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et biophysica acta*, **1662**, 3-21.

Shichiri, M., Hirata, Y., Nakajima, T., Ando, K., Imai, T., Yanagisawa, M., Masaki, T. & Marumo, F. (1991) Endothelin-1 is an autocrine/paracrine growth factor for human cancer cell lines. *J Clin Invest*, **87**, 1867-1871.

Shigematsu, T., Miura, S., Hirokawa, M., Hokari, R., Higuchi, H., Watanabe, N., Tsuzuki, Y., Kimura, H., Tada, S., Nakatsumi, R.C., Saito, H. & Ishii, H. (1998) Induction of endothelin-1 synthesis by IL-2 and its modulation of rat intestinal epithelial cell growth. *Am J Physiol*, **275**, G556-563.

Simard, M. & Nedergaard, M. (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, **129**, 877-896.

Siren, A.L., Lewczuk, P., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Schilling, L. & Ehrenreich, H. (2002) Endothelin B receptor deficiency augments neuronal damage upon exposure to hypoxia-ischemia in vivo. *Brain Res*, **945**, 144-149.

Sjostrand, F.S. & Andersson, E. (1954) Electron microscopy of the intercalated discs of cardiac muscle tissue. *Experientia*, **10**, 369-370.

Sohl, G. & Willecke, K. (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell communication & adhesion*, **10**, 173-180.

Su, Z., Chen, J., Qiu, Y., Yuan, Y., Zhu, F., Zhu, Y., Liu, X., Pu, Y. & He, C. (2013) Olfactory ensheathing cells: the primary innate immunocytes in the olfactory pathway to engulf apoptotic olfactory nerve debris. *Glia*, **61**, 490-503.

Tanfin, Z., Leiber, D., Robin, P., Oyeniran, C. & Breuiller-Fouche, M. (2011) Endothelin-1: physiological and pathological roles in myometrium. *Int J Biochem Cell Biol*, **43**, 299-302.

Tence, M., Ezan, P., Amigou, E. & Giaume, C. (2012) Increased interaction of connexin43 with zonula occludens-1 during inhibition of gap junctions by G protein-coupled receptor agonists. *Cell Signal*, **24**, 86-98.

Thyssen, A., Hirnet, D., Wolburg, H., Schmalzing, G., Deitmer, J.W. & Lohr, C. (2010) Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 15258-15263.

Thyssen, A., Stavermann, M., Buddrus, K., Doengi, M., Ekberg, J.A., St John, J.A., Deitmer, J.W. & Lohr, C. (2013) Spatial and developmental heterogeneity of calcium signaling in olfactory ensheathing cells. *Glia*, **61**, 327-337.

Trosko, J.E. & Ruch, R.J. (1998) Cell-cell communication in carcinogenesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **3**, d208-236.

Trotier, D. (1998) Electrophysiological properties of frog olfactory supporting cells. *Chem Senses*, **23**, 363-369.

van den Buuse, M. & Webber, K.M. (2000) Endothelin and dopamine release. *Prog Neurobiol*, **60**, 385-405.

Venance, L., Premont, J., Glowinski, J. & Giaume, C. (1998) Gap junctional communication and pharmacological heterogeneity in astrocytes cultured from the rat striatum. *J Physiol*, **510 (Pt 2)**, 429-440.

Venance, L., Stella, N., Glowinski, J. & Giaume, C. (1997) Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J Neurosci*, **17**, 1981-1992.

Verhaagen, J., Oestreicher, A.B., Gispen, W.H. & Margolis, F.L. (1989) The expression of the growth associated protein B50/GAP43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *J Neurosci*, **9**, 683-691.

Verkhratsky, A. & Steinhauser, C. (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Res Brain Res Rev*, **32**, 380-412.

Vincent, A.J., West, A.K. & Chuah, M.I. (2003) Morphological plasticity of olfactory ensheathing cells is regulated by cAMP and endothelin-1. *Glia*, **41**, 393-403.

Vincent, A.J., West, A.K. & Chuah, M.I. (2005) Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *J Neurocytol*, **34**, 65-80.

Vogalis, F., Hegg, C.C. & Lucero, M.T. (2005a) Electrical coupling in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *J Neurophysiol*, **94**, 1001-1012.

Vogalis, F., Hegg, C.C. & Lucero, M.T. (2005b) Ionic conductances in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *J Physiol*, **562**, 785-799.

Walz, W. (2002) Chloride/anion channels in glial cell membranes. *Glia*, **40**, 1-10.

Wang, H., Hong, T. & Wang, Y. (2009) Altered expression of connexin43 and its possible role in endothelin-1-induced contraction in rabbit basilar artery. *Neurological research*, **31**, 67-73.

Wang, Y., Song, J.H., Denisova, J.V., Park, W.M., Fontes, J.D. & Belousov, A.B. (2012) Neuronal gap junction coupling is regulated by glutamate and plays critical role in cell death during neuronal injury. *J Neurosci*, **32**, 713-725.

Webber, K.M., Pennefather, J.N., Head, G.A. & van den Buuse, M. (1998) Endothelin induces dopamine release from rat striatum via endothelin-B receptors. *Neuroscience*, **86**, 1173-1180.

Wei, C.J., Xu, X. & Lo, C.W. (2004) Connexins and cell signaling in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, **20**, 811-838.

Weidmann, S. (1952) The electrical constants of Purkinje fibres. *J Physiol*, **118**, 348-360.

Wewetzer, K., Verdu, E., Angelov, D.N. & Navarro, X. (2002) Olfactory ensheathing glia and Schwann cells: two of a kind? *Cell Tissue Res*, **309**, 337-345.

Wilkins, P.L., Suchovsky, D. & Berti-Mattera, L.N. (1997) Immortalized schwann cells express endothelin receptors coupled to adenylyl cyclase and phospholipase C. *Neurochem Res*, **22**, 409-418.

Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U. & Sohl, G. (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem*, **383**, 725-737.

Williams, S.K., Gilbey, T. & Barnett, S.C. (2004) Immunohistochemical studies of the cellular changes in the peripheral olfactory system after zinc sulfate nasal irrigation. *Neurochem Res*, **29**, 891-901.

Woodhall, E., West, A.K. & Chuah, M.I. (2001) Cultured olfactory ensheathing cells express nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, glia cell line-derived neurotrophic factor and their receptors. *Brain Res Mol Brain Res*, **88**, 203-213.

Wright, C.E. & Fozard, J.R. (1988) Regional vasodilation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anaesthetized, spontaneously hypertensive rats. *European journal of pharmacology*, **155**, 201-203.

Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. & Masaki, T. (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, **332**, 411-415.

Yoshizawa, T., Kimura, S., Kanazawa, I., Uchiyama, Y., Yanagisawa, M. & Masaki, T. (1989) Endothelin localizes in the dorsal horn and acts on the spinal neurones: possible involvement of dihydropyridine-sensitive calcium channels and substance P release. *Neurosci Lett*, **102**, 179-184.

Youngentob, S.L. & Kent, P.F. (1995) Enhancement of odorant-induced mucosal activity patterns in rats trained on an odorant identification task. *Brain Res*, **670**, 82-88.

Zhang, C., Finger, T.E. & Restrepo, D. (2000) Mature olfactory receptor neurons express connexin 43. *J Comp Neurol*, **426**, 1-12.

Zhang, C. & Restrepo, D. (2002) Expression of connexin 45 in the olfactory system. *Brain Res*, **929**, 37-47.

Zhang, X. & Firestein, S. (2002) The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nat Neurosci*, **5**, 124-133.

Zidovetzki, R., Chen, P., Chen, M. & Hofman, F.M. (1999) Endothelin-1-induced interleukin-8 production in human brain-derived endothelial cells is mediated by the protein kinase C and protein tyrosine kinase pathways. *Blood*, **94**, 1291-1299.

VII. Article

EJN European Journal of Neuroscience

FENS Federation of European Neuroscience Societies

European Journal of Neuroscience, pp. 1–10, 2014 doi:10.1111/ejn.12665

Endothelin uncouples gap junctions in sustentacular cells and olfactory ensheathing cells of the olfactory mucosa

Mikaël Le Bourhis,[1,2,3] Stéphanie Rimbaud,[2,3,4] Denise Grebert,[2,3] Patrice Congar[2,3] and Nicolas Meunier[2,3,4]
[1]Université d'Evry Val d'Essone, Evry, France
[2]Domaine de Vilvert, INRA, UR1197 Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie, Biologie de l'Olfaction et Biosenseurs, Jouy en Josas, France
[3]Neuro-Sud, IFR 144, Paris, France
[4]Université de Versailles Saint-Quentin en Yvelines, Versailles, France

Keywords: calcium signals, glial cells, olfaction, olfactory mucosa, rat, slices

Abstract

Several factors modulate the first step of odour detection in the rat olfactory mucosa (OM). Among others, vasoactive peptides such as endothelin might play multifaceted roles in the different OM cells. Like their counterparts in the central nervous system, the olfactory sensory neurons are encompassed by different glial-like non-neuronal OM cells; sustentacular cells (SCs) surround their cell bodies, whereas olfactory ensheathing cells (OECs) wrap their axons. Whereas SCs maintain both the structural and ionic integrity of the OM, OECs assure protection, local blood flow control and guiding of olfactory sensory neuron axons toward the olfactory bulb. We previously showed that these non-neuronal OM cells are particularly responsive to endothelin *in vitro*. Here, we confirmed that the endothelin system is strongly expressed in the OM using *in situ* hybridization. We then further explored the effects of endothelin on SCs and OECs using electrophysiological recordings and calcium imaging approaches on both *in vitro* and *ex vivo* OM preparations. Endothelin induced both robust calcium signals and gap junction uncoupling in both types of cells. This latter effect was mimicked by carbenoxolone, a known gap junction uncoupling agent. However, although endothelin is known for its antiapoptotic effect in the OM, the uncoupling of gap junctions by carbenoxolone was not sufficient to limit the cellular death induced by serum deprivation in OM primary culture. The functional consequence of the endothelin 1-induced reduction of the gap junctional communication between OM non-neuronal cells thus remains to be elucidated.

Introduction

It has long been thought that modulation of sensory systems only occurred in the central nervous system but recurrent evidence of their plastic nature has been unravelled over the past decade at the level of the peripheral sensory systems. Interestingly, some of these regulations have been clearly shown to involve non-neuronal/glial cells of sensory organs (as reviewed by Pack & Pawson (2010)). The olfactory mucosa (OM) is one of the most regulated sensory system, due to its sustained regenerative capacities (Schwob, 2002). Furthermore, part of the autocrine, paracrine or endocrine modulations of the OM implicates non-neuronal cells (nNCs), i.e. sustentacular cells (SCs) (Lucero, 2013) and olfactory ensheathing cells (OECs) (Chuah & West, 2002). Our previous reports on OM primary cultures identified endothelin (ET) as a potent endogenous modulator of this tissue. Indeed, we have established that ET-1 (the most widely distributed form of ET in the central nervous system), ECE-1 (the ET-converting enzyme that catalyses the conversion of the biologically inactive Big-ET-1 into active ET-1) and the two main forms of ET receptors (ET_A and ET_B) are expressed in the rat OM. Our results suggest that the robust ET-mediated Ca^{2+} signals could serve distinct signalling functions, and thereby different functional roles in both neuronal and non-neuronal OM cells (Gouadon *et al.*, 2010). Subsequently, we showed that ET-1 acts as a neuroprotective factor, both directly, protecting olfactory sensory neurons (OSNs), and indirectly, limiting nNC death (Laziz *et al.*, 2011).

In the present study, we aimed to further characterize the effects of ET-1 on the sustentacular and olfactory ensheathing OM cells. We first clarified the expression of the ET system in the OM *in vivo* using *in situ* hybridization. Then, by means of electrophysiological recordings and calcium imaging approaches, we explored the effects of ET-1 on SCs and OECs, using *in vitro* and *ex vivo* preparations of the OM. Our results show that ET-1 induces robust calcium responses in both SCs and OECs in OM slices. Using patch-clamp recordings and Ca^{2+} imaging techniques in OM primary cultures, we further characterized the physiological effects of ET-1 in SCs and OECs. We found that ET-1, like carbenoxolone (CBX) and 18α-glycyrrhetinic acid (18α-GA), induced a rapid increase of the membrane resistance of those cells but also limited intercellular Ca^{2+} wave propagation. As both SCs and OECs are coupled by gap junctions (Barnett *et al.*, 2001; Vogalis *et al.*, 2005), our results are consistent with a decrease of gap junctional communications by ET-1 in OM nNCs.

Correspondence: Mikaël Le Bourhis and Nicolas Meunier, [2]INRA, as above.
E-mails: mlebourhis@jouy.inra.fr and nicolas.meunier@jouy.inra.fr

Received 27 January 2014, revised 28 May 2014, accepted 2 June 2014

© 2014 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd

Materials and methods

Animals

Male Wistar rat (*Rattus norvegicus*) pups were obtained from multiparous females, and housed in our local animal care facilities [Unité Expérimentale Animalerie Rongeurs (UEAR), Jouy-en-Josas, France] in a 12 h/12 h light/dark cycle. Mothers were supplied with water and standard chow *ad libitum* and bedding was changed weekly. All animal experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes, and approved by our French Local Ethics Committee (Comethea, CNREEA no. 45; protocol approval no.12-058). P.C. holds the Individual Authorization for Performing Experiments in Animals, including the animal experiments conducted in the present study, provided by Préfecture des Yvelines (France), according to French and European laws (agreement nos 78-154).

In situ *hybridization*

Male Wistar rats [postnatal day (P)10] were deeply anaesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg; CEAV, Libourne, France) and perfused transcardially with a freshly prepared fixative solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS). The OM was dissected as a block, postfixed in the same fixative for 3 h at room temperature ($\sim$20 °C), cryoprotected with saccharose (30%) and cut into 14-μm-thick serial horizontal OM sections using a cryostat. The slide-mounted sections were stored at −80 °C until use. The expression of ECE-1, ET-1, ET_A and ET_B was assessed using digoxigenin (DIG)-labelled RNA probes transcribed *in vitro* (DIG RNA labelling kit from Roche) from target sequences subcloned into a pGEM-T plasmid (Promega) from GenBank (ECE-1 nucleotide 1904–2368, NM_053596.2; ET-1 nucleotide 347–846, NM_012548.2; ET_A nucleotide 1403–1512, NM_012550.2; ET_B nucleotide 1361–1475, NM_017333.1). After rehydration in successive baths of ethanol (from 100 to 50%), slide-mounted sections were treated with proteinase K (10 μg/mL) for 4 min at 37 °C and incubated in acetylation solution (0.1 M triethanolamine and 0.25% anhydrous acetic acid) for 10 min. Subsequently slides were dehydrated by a series of ethanol baths and air-dried. The DIG-labelled probes (0.1 μg/μL) were denaturated beforehand at 68 °C for 10 min, then added in the hybridization mix (10% Dextran and 50% formamide) and hybridized overnight at 55 °C. Slides were then sequentially washed in 2× standard sodium citrate (2 × 30 min), 50% formamide (30 min at 55 °C), 2 × standard sodium citrate (2 × 10 min at 37 °C) and RNAse A solution (20 μg/mL, 30 min at 37 °C). Immunodetection was performed using the DIG Nucleic Acid Detection kit (Roche) following the supplier's recommendations.

Olfactory mucosa primary cultures

We used a long-term primary culture of rat OM cells with slight modifications from our previously described protocol (Gouadon *et al.*, 2010). Briefly, for each experiment, three to four Wistar male rats (P7–P10) were killed by decapitation. The entire OM was dissected from the turbinates and the olfactory part of the septum. After enzymatic digestion and mechanical dissociation, cells were suspended in sterile Hepes-buffered Dulbecco's modified Eagle's medium/HamF12-based medium (Eurobio, Les Ulis, France) containing 10% newborn calf serum (Eurobio), counted and plated at approximately 700 cells/mm^2 on glass coverslips previously coated with poly-L-lysine. Cells were grown at 37 °C under 5% CO_2 in Dulbecco's modified Eagle's medium/HamF12-based medium with 10% newborn calf serum. After approximately 7 days, primary culture cells became confluent and the DNA synthesis inhibitor 5-fluoro-2′-deoxyuridine (10 μM; Invitrogen, Cergy Pontoise, France) was added to block further cell proliferation. As previously described (Gouadon *et al.*, 2010), at this stage OM primary cultures comprised a major proportion of OECs and a minor proportion of other nNCs, including small patches of SCs located at the periphery of the coverslip.

Olfactory mucosa and olfactory bulb slice preparation

As cartilage and bone formation prevents OM slicing in animals older than 4–5 postnatal days, OM and olfactory bulb (OB) slices were prepared from male Wistar rat pups (P0–P3 and P10–13, respectively) killed by decapitation. For the OM slice preparation, the upper skull bone, lower jaw, teeth and palate were removed and the anterior part of the head was embedded in 4% low-gelling-temperature Type VIIa agarose, placed in ice-cold artificial cerebrospinal fluid (ACSF) solution containing (in mM): 124 NaCl, 5 KCl, 1.25 NaH_2PO_4, 2 $MgSO_4$, 2 $CaCl_2$, 26 $NaHCO_3$ and 10 glucose, saturated with 95% O_2 and 5% CO_2, pH 7.4, ~300 mOsmol/L. For the preparation of OB slices, the skull was opened and the brain with the OBs was carefully removed as a block and rapidly placed in ice-cold ACSF. The posterior half of the brain was cut and removed. For both preparations, coronal slices (250 μm) were cut using a vibratome (VT1200S; Leica Microsystems, LEICA Microsystèmes SAS, Nanterre, France), and kept submerged in oxygenated ACSF at room temperature until use.

Patch-clamp recordings

The electrophysiological experiments were performed at room temperature on OM SCs and OECs in primary cultures maintained for 7–10 days *in vitro*. Culture coverslips were transferred to a small custom-made laminar volume perfusion flow recording chamber mounted on an inverted microscope (Olympus IX71) and continuously superfused using a gravity flow system (2.5 mL/min) with a normal saline solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 HEPES, 6 sucrose, 10 glucose, pH 7.4, ~300 mOsm/L. The depth of the bath was kept to a minimum to reduce pipette capacitance artefacts. Drugs [10^{-7} M ET-1 alone or in mixture with 10^{-6} M BQ_{123}, 10^{-7} M Sarafotoxin 6C (S6C), 10^{-4} M ATP, 10^{-4} M CBX and 2.10^{-5} and 10^{-4} M 18α-GA] were diluted in the same saline solution and bath applied with a delay between valve opening and onset of drug action of approximately 15 s. Cells were primarily identified based on their clearly different and specific flat (SCs) or process-bearing (OECs) morphologies (Fig. 4A–C). They were recorded in whole-cell configuration using pipettes pulled from borosilicate thick-walled glass tubes to have resistances of 4–5 MΩ when filled with an intrapipette solution containing (in mM): 140 $KMeSO_4$, 10 NaCl, 0.1 EGTA, 4 MgATP, 0.5 GTP (Tris salt), 10 HEPES, pH 7.4, ~300 mOsm/L. Whole-cell currents were recorded in voltage-clamp configuration using a patch-clamp amplifier (RK 300; Bio-Logic SAS, Claix, France), low-pass five-pole Tchebicheff filtered at 0.3 KHz and digitized at a rate of 50 kHz using an Digidata 1322a A/D converter (Axon Instruments, Molecular Devices, Union City, CA, USA) interfaced to a Pentium PC and PCLAMP 9.2 software (Axon Instruments). Junction potentials were nulled before establishment of whole-cell configuration. The capacitive compensation circuit of the amplifier was used to

© 2014 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd

reduce capacitive transients. Measurement of cell membrane resistance were performed offline, from recordings of capacitive currents elicited by repetitive 400 ms, 20 mV hyperpolarizing voltage steps from a holding potential of −60 mV, at a frequency of 0.03 Hz. The membrane resistance was calculated at the steady-state of the current response, and its change was expressed as a percentage of the pretreatment value.

After patch-clamp recordings, a labelling of the recorded field was performed to allow the identification of the recorded cells using posthoc immunofluorescent staining (according to the Immunocytochemistry protocol described below). The identities of SCs and OECs were confirmed based on the specific expression of the S100 calcium-binding protein β-subunit (Barber & Lindsay, 1982) and cytokeratin 18, respectively (Jang *et al.*, 2008)) (Fig. 4B–D).

Immunocytochemistry

Culture coverslips containing the recorded cells were fixed with a freshly prepared solution of 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS. Non-specific staining was blocked by incubation with non-immune serum appropriate to the secondary antibody, diluted in PBS containing 2% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 (1 : 10; 1 h at room temperature). The cells were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies directed against cytokeratin 18 (1 : 50 mouse monoclonal, clone RGE 53; Servibio, Meudon, France) and S100 calcium-binding protein β-subunit (1 : 1000 rabbit polyclonal; Sigma Aldrich, SaintQuentin Fallavier, France) diluted in PBS containing 0.2% bovine serum albumin and 0.05% Triton X-100. Fluorescence staining was performed with Alexa-Fluor-488- and Alexa-Fluor-546-conjugated secondary antibodies (1 : 1000; Molecular Probes; Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Finally, the cells were rinsed extensively in PBS and mounted in DAPI-containing Vectashield (AbCys, Paris, France).

Calcium imaging

The ET-evoked responses in the different OM/OB nNCs were monitored using microscopic epifluorescence imaging of Ca^{2+} concentrations in OM primary cultures, OM and OB slices. In OM primary cultures, intracellular Ca^{2+} dynamics were monitored in cells loaded with Fura-2 AM, using a dedicated Xcellence RT imaging station (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany) as previously described (Gouadon *et al.*, 2010). Standard image pairs of Fura-2 fluorescence, excited at 340 and 380 nm, were acquired at 510 nm, at a frequency of 1 Hz, with minimal exposure times (100–200 ms) to minimize bleaching, using a UPlanApo oil-immersion objective with a 10× magnification (N.A. 0.40). Images were background subtracted and the kinetics of the Fura-2 fluorescence ratios 340 : 380 nm of defined regions of interest (ROIs) were calculated offline and normalized to the baseline averaged ratio.

In OM and OB slices, intracellular Ca^{2+} dynamics were monitored in cells loaded with the calcium-sensitive dye Oregon green BAPTA-1 (2 mM stock solution in dimethyl sulphoxide), mixed 1 : 1 with 20% Pluronic F-127 (Molecular Probes) and diluted in oxygenated ACSF to a loading solution of 8×10^{-6} M. Slices were kept in the loading solution for 30–40 min, at 37 °C, followed by a washing-out period of at least 15 min in oxygenated ACSF. Slices were transferred to a home-made recording chamber under the 20× long-range water-immersion objective (XLUMPLFL20XW, NA 0.95) of an upright microscope (BX51WI, Olympus, Rungis, France), equipped with differential interference contrast and an infrared video camera. The chamber was continuously gravity perfused with oxygenated ACSF at a rate of 2.5–3 mL/min. Slices were stimulated with 10^{-7} M ET-1, 10^{-7} M S6C or 10^{-4} M ATP applied to the perfusion bath, with a delay between valve opening and the onset of drug action of ~1 min. Fluorescence measurements were performed using a dedicated Xcellence RT real-time live-cell imaging system (Olympus Soft Imaging Solutions) consisting of a computer-controlled fast illumination MT20 system with a 150 W mercury–xenon mixed-gas short-arc burner, and a cooled C9100-13 EM-CCD camera (Hamamatsu Photonics, Massy, France). Fluorescence images were collected at 535 nm at 1 Hz, with minimal exposure times (10–100 ms). For OM slices, ROIs were drawn around individual SCs and around the SC nuclei zone, i.e. the apical 25% of the olfactory epithelium (Moon *et al.*, 2009), or including the ensheathing cell in the lamina propria area (Rela *et al.*, 2010). For OB slices, six circular ROIs were drawn in the olfactory nerve layer. For offline analysis of calcium transients, images were background subtracted and changes in fluorescence were calculated relative to the averaged baseline (from 30 s before stimulation) and expressed as $\%\Delta F/F$ ($[(F - F_{baseline})/F_{baseline}] \times 100$) using XCELLENCE RT software.

Electrical stimulation of olfactory mucosa primary cultures

We adapted a protocol classically used to study gap junctional communication between astrocytes (Venance *et al.*, 1998). We performed electrical stimulations on OM primary cultures and measured the propagation of the induced calcium wave between nNCs. The stimulating protocol consisted of two successive electrical pulses (1 s duration, 150 μA) delivered at a 10 min interval to one nNC in the centre of the imaged zone, using patch pipettes (~4 MΩ) filled with 1.5 M NaCl. Offline analysis of fluorescence intensities was performed in a 50-μm-wide annular ROI located 100 μm from the centre of the stimulated zone. We calculated the ratio of maximum fluorescent intensity in this ROI between the two stimulations. While perfused with saline solution, we observed only a slight decrease of calcium propagation between the two successive stimulations (up to 5%).

In order to evaluate the gap junction coupling in this calcium propagation, we successively delivered the same stimulating protocol to two neighbouring zones on each coverslip (Fig. 3A). The electrical pulse parameters and cell–pipette distance were kept identical for both imaged zones for a given coverslip. The two electrical stimulations in zone 1 were both performed in the presence of saline solution, whereas in zone 2, the second stimulation was performed after bath application of a known gap junction uncoupling agent (2×10^{-5} M 18α-GA and 10^{-4} M CBX), 10^{-7} M ET-1, 10^{-4} M ATP or saline solution (control). The extent of the calcium propagation, and the propagation decrease between the two successive stimulations, were similarly quantified for both zones. Finally, the propagation decrease between two successive stimulations observed in zone 2 was normalized to the propagation decrease observed in zone 1, to overcome variability between different coverslips.

Assessment of cellular death by lactate dehydrogenase release

The cell death induced by 24 h serum deprivation was assessed by quantifying the release of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture medium of 7 day OM primary cultures, as described previously (Laziz *et al.*, 2011). The LDH concentration is proportional to the rate of NADH oxidation. We thereby measured the activities of both the extracellular and intracellular LDH, respectively, from the

© 2014 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd

bathing culture medium and from the primary cultured adherent cells extemporaneously lysed with PBS + 0.5% triton X-100. The release of LDH in the bathing medium was expressed as a percentage of the total LDH measured (bathing medium + adherent lysed cells).

Statistical analysis

The group data presented in the text and figures are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was assessed using two-tailed/non-directional non-parametric Wilcoxon and Mann–Whitney tests for paired and unpaired data, respectively (PRISM SOFTWARE; GraphPad Software Inc., CA, USA). A probability value of $P \leq 0.05$ was set for significant differences.

Chemicals

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma Aldrich.

Results

Components of the endothelin 1 signalling pathway are expressed in the olfactory mucosa

We had previously shown an expression of the ET system in a primary culture of OM cells (Gouadon *et al.*, 2010). Before exploring the effects of ET-1 on a preserved preparation of the OM, we further examined the expression of this signalling system in OM sections using *in situ* hybridization. We used probes to localize mRNAs coding for the propeptide Big-ET-1, ET-converting enzyme type 1 (ECE-1 catalysing the conversion of the biologically inactive Big-ET-1 into active ET-1), and the two ET receptors, ET_A and ET_B. The OE cell bodies are organized in three distinct layers located above the lamina propria. The innermost basal layer holds basal cells and immature neurons, and represents 25% of the OE. The middle 50% contains most of the mature neuron cell bodies. Finally, the outer layer of the OE is made of SCs and OSN dendritic knobs/cilia (Moon *et al.*, 2009). DIG-labelled antisense probes revealed a strong signal for all components of the ET system in the neuronal and basal cell layer (Fig. 1). In contrast, the layer of SCs was more heterogeneously stained, whereas ECE-1 and both ET_A and ET_B receptors were quite homogeneously distributed but at a weaker level than in other cell layers of the OE (black arrows in Fig. 1E, H and K), Big-ET-1 was seldom present in SCs (black arrow in Fig. 1B). Interestingly, the expression of the ET system was not restricted to the OE. In the lamina propria, Big-ET-1, ECE-1, ET_A and ET_B were more sparsely expressed, but visibly concentrated in small patches of cells surrounding axon bundles (red arrowheads in Fig. 1A, D, G and J), which have been described as comprising OECs (Nakajima *et al.*, 2013). Negative controls using sense probes, under identical conditions, showed no staining at all (Fig. 1C, F, I and L).

Endothelin 1 activates sustentacular cells and olfactory ensheathing cells ex vivo

We next examined the functionality of the ET system using calcium imaging on OM slices. We observed, at low magnification, that transient application of ET-1 evoked robust calcium rises in the SC body layer (Fig. 2D and E), and in the submucosal region containing the OSN axons and OEC processes (Fig. 2D and I). OSN cell bodies responded very rarely to ET-1 with an intracellular calcium increase (data not shown). In contrast, the application of the selective ET_B agonist S6C failed to elicit a similar change in intracellular calcium level in the same regions (Fig. 2F and J). We decided to first focus our study on the prominent SC calcium responses. In addition to a global and sustained intracellular calcium rise evoked by ET-1, in almost all of the observed SCs (Fig. 2E and F), we noticed fast calcium transients, which were superimposed on the slow calcium rise (Fig. 2G). Such calcium transients were already observed in the basal condition in a few individual SCs and their frequency significantly increased upon ET-1 stimulation (two-tailed Wilcoxon test, $W_6 = -21.00$, $P = 0.0313$; Fig. 2H). However, we did not notice any significant synchronization of the SC Ca^{2+} transients by ET-1. To compare the ET-1-evoked responses in SCs with the effect of a known SC modulator, we then used ATP to generate a calcium increase in the SCs, as described previously (Hegg *et al.*, 2003). We observed a more robust calcium rise in the SC layer, the amplitude of which was almost twice the ET-1-induced response (Fig. 2F). We next examined more closely the cells activated in the lamina propria (Fig. 2D). ET-1 induced a stronger and longer-lasting calcium rise in a zone corresponding to the axon bundles containing OECs (Fig. 2I). In contrast to SCs, fast calcium transients were less frequently noticed, but the response to ET-1 of those cells was even more robust than in SCs, and almost equivalent to that induced by ATP (Fig. 2J). Although we could easily identify the cells responding in the OE, through its clear laminar organization, the individual monitoring and identification of the responding cells in the lamina propria were more difficult. As we previously demonstrated that OECs in OM primary cultures are very sensitive to ET-1 (Gouadon *et al.*, 2010), we suspected these lamina propria responding cells to be OECs. We thus further examined the ET-1-induced responses in the better characterized OECs of the OB olfactory nerve layer (Vincent *et al.*, 2003; Thyssen *et al.*, 2010) (Fig. 2K and L). As in the lamina propria, the olfactory nerve layer OECs displayed a strong and prolonged calcium response to ET-1. ATP also induced a clear but weaker and shorter response in the OB compared with the lamina propria OECs (Fig. 2M–P). We also observed that the ET-1-induced calcium responses in both the OM lamina propria and OB olfactory nerve layer were accompanied by significant constriction of these regions (data not shown).

Endothelin 1 limits calcium wave spreading between non-neuronal cells in a primary culture of the olfactory mucosa

Both SCs and OECs are well known to be connected through gap junctions (Barnett *et al.*, 2001; Vogalis *et al.*, 2005; Rela *et al.*, 2010), and ET-1 is known as a decoupling agent in astrocytes of the central nervous system (Giaume *et al.*, 1992). In order to evaluate whether ET-1 could act similarly in nNCs of the OM, we evaluated in OM primary culture its potential influence on gap junction coupling within nNCs. We therefore monitored the propagation of a calcium wave triggered by the electrical stimulation of one nNC. Upon such stimulations, we observed a reproducible radial propagation of the induced calcium rise. In order to take into account the variability of the primary culture, we performed two successive stimulation protocols in two different zones of the same coverslip (experimental design in Fig. 3A). When quantified upon continuous perfusion of the control saline solution, on both zones, there was no significant difference between the calcium propagation in zone 1 and zone 2 (two-tailed Mann–Whitney test, $U_8 = 7.00$, $P = 0.8857$; Fig. 3D, 'saline'). Similarly, there was no significant change when the second stimulation of zone 2 was performed in the presence of ATP (two-tailed Mann–Whitney test, $U_{14} = 24.00$, $P = 1.0000$; Fig. 3D, 'ATP'). However, the propagation was significantly decreased in the presence of 10^{-7} M ET-1 (two-tailed Mann–Whitney test, $U_{28} = 34.00$, $P = 0.0043$) or

© 2014 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd

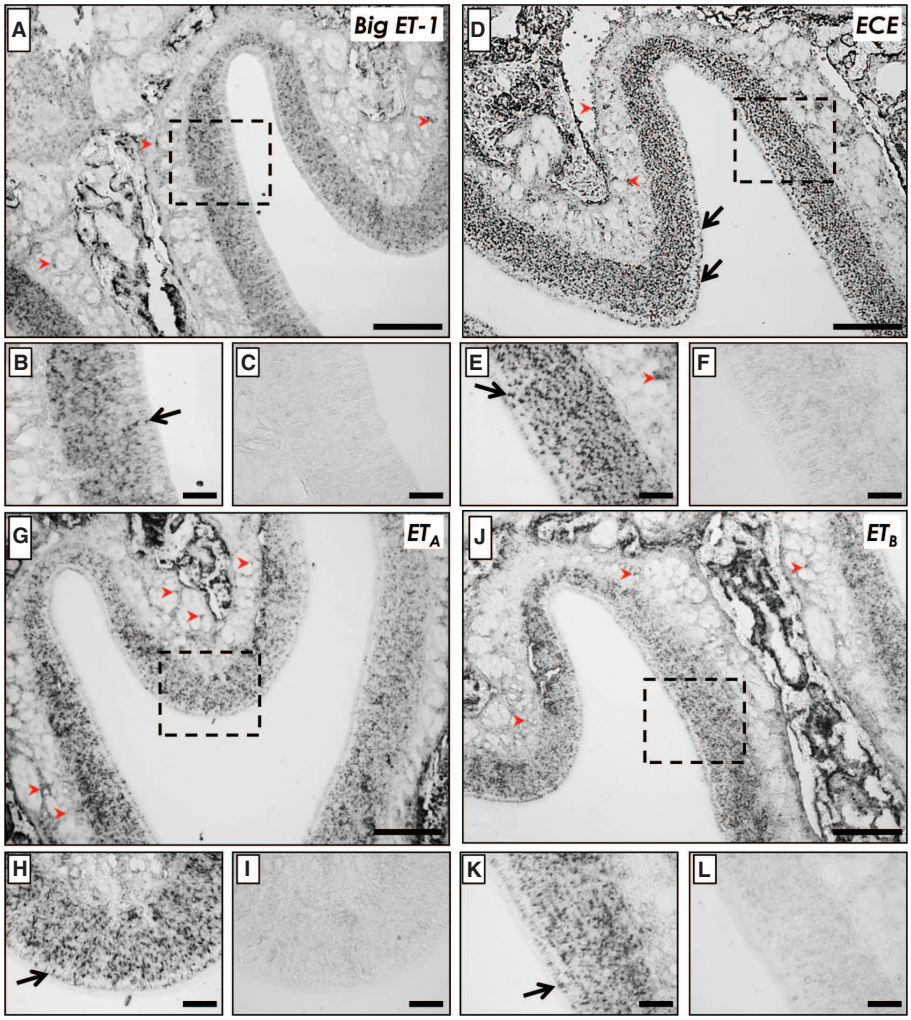


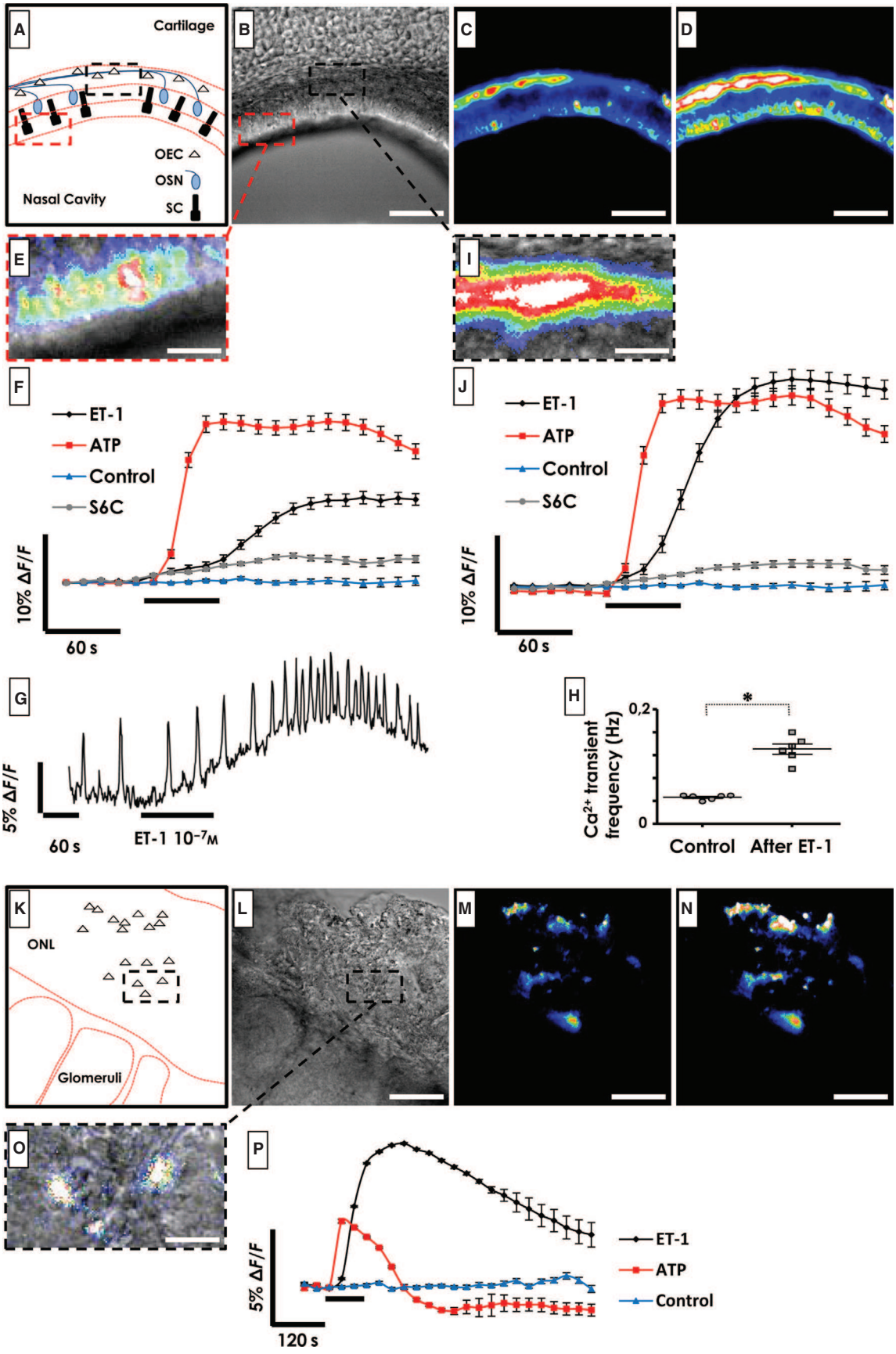
FIG. 1. ET components are expressed in the OM. Bright-field microscopy images of OM sections showing the expression of ET-related mRNA in the OM by *in situ* hybridization. A similar pattern of expression was observed for the various components of the ET system: the propeptide Big-ET-1 (A), the converting enzyme ECE-1 (D), and both ET receptors ET_A (G) and ET_B (J). For each panel (A, D, G and J; scale bar 200 μm), the lower left image (B, E, H and K; scale bar 50 μm) shows details (dashed rectangle) of the main image at higher magnification, whereas the lower right image (C, F, I and L; scale bar 50 μm) shows the same zone on the following section hybridized with the sense probe as a control. For all components of the ET system, most of the signal was localized in the neuronal and basal cell layers of the OE. Weaker signals were also observed in the SC layer (black arrows) and in the lamina propria around the axon bundles (red arrowheads).

the gap junction uncoupling agents 10^{-4} M CBX (two-tailed Mann–Whitney test, $U_{20} = 4.00$, $P = 0.0001$) and 2.10^{-5} M 18α-GA (two-tailed Mann–Whitney test, $U_{16} = 11.00$, $P = 0.0281$) (Fig. 3C and D).

Endothelin 1 induces gap junction uncoupling in sustentacular cells and olfactory ensheathing cells of olfactory mucosa primary culture

Although the reduction of electrical stimulation propagation in the primary culture clearly suggested an ET-1-mediated reduction of gap junction connectivity between nNCs, this approach did not allow us to identify the cell type affected (SCs and/or OECs). We therefore performed patch-clamp whole-cell recordings of SCs and OECs. These cells were preidentified by their morphology (Fig. 4A and C) and their identity was confirmed posthoc by immunocytochemistry directed against CK-18 and S100 calcium-binding protein β-subunit, selective markers of SCs and OECs, respectively (Fig. 4B and D). The input resistance of OECs or SCs was monitored by regular application of hyperpolarizing steps (Fig. 4E) as previously described (Blomstrand *et al.*, 2004). The recordings were made for 10 min without drug application to ensure the stability of the input resistance of the recorded cells. The induced membrane currents were measured in response to voltage steps before, during and after the bath perfusion of saline (control), 10^{-4} M CBX, 10^{-7} M ET-1 or 10^{-4} M ATP. The input resistance remained stable after saline application in SCs (two-tailed Wilcoxon tests, $W_8 = -8.00$, $P = 0.6406$) and slightly decreased in OECs (two-tailed Wilcoxon tests, $W_{12} = 52.00$, $P = 0.0425$). The changes of input resistance were expressed as a percentage of the pretreatment value and statistically compared with the control effect of saline (Fig. 4F and G). We observed a significant decrease of current amplitude corresponding to an increase of the input resistance, in both SCs and OECs, upon application of ET-1 (two-tailed Mann–Whitney tests: SCs: $U_{19} = 0.00$, $P < 0.0001$; OECs: $U_{16} = 0.00$, $P < 0.0001$) and CBX (two-tailed Mann–Whitney tests; SCs: $U_{19} = 0.00$, $P < 0.0001$; OECs: $U_{21} = 0.00$, $P < 0.0001$). In contrast, ATP did not induce any significant effect on the input resistance in either SCs (two-tailed Mann–Whitney tests, $U_{13} = 30.00$,

© 2014 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd


A
Cartilage
OEC
OSN
SC
Nasal Cavity
B
C
D
E
I
F
ET-1
ATP
Control
S6C
10% ΔF/F
60 s
J
ET-1
ATP
Control
S6C
10% ΔF/F
60 s
G
5% ΔF/F
60 s
ET-1 10⁻⁷M
H
Ca²⁺ transient frequency (Hz)
0,2
0
*
Control
After ET-1
K
ONL
Glomeruli
L
M
N
O
P
5% ΔF/F
120 s
ET-1
ATP
Control

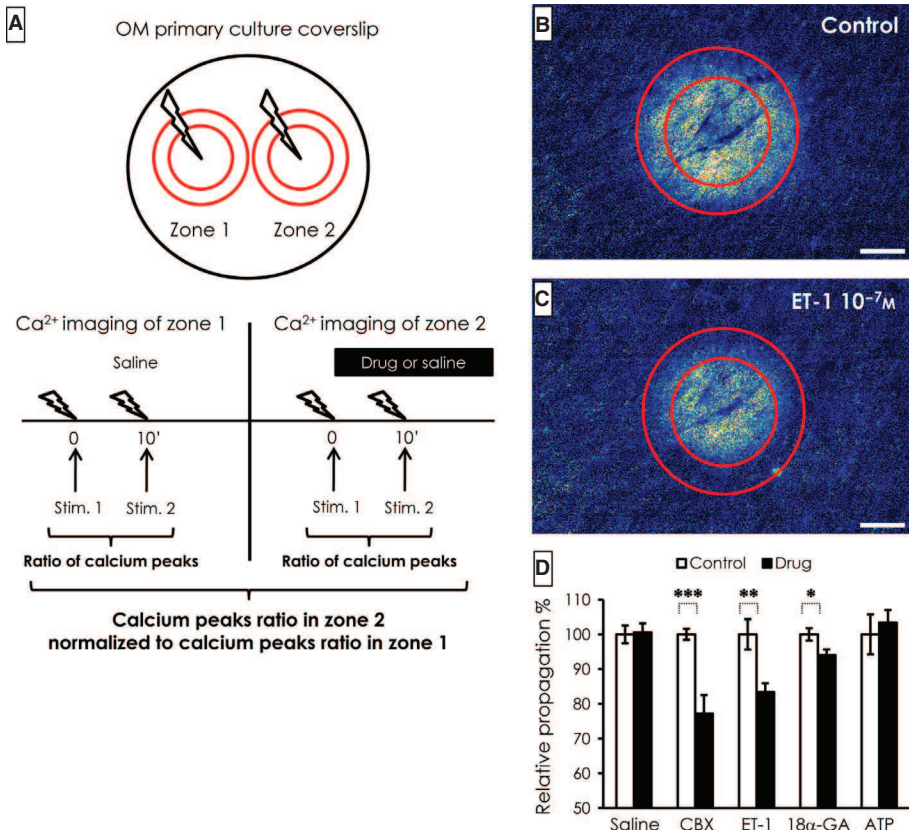


FIG. 3. ET inhibits the intercellular propagation of calcium transients in nNCs of OM primary culture. (A) Schematic electrical stimulation protocol. The intercellular propagation of a calcium wave through neighbouring nNCs was monitored by calcium imaging in two zones for each OM primary culture coverslip used. The calcium rises were generated by electrical stimulation delivered to an nNC located in the centre of the concentric ROIs. The ratio of maximal calcium wave spreading between two successive stimulations was normalized to zone 1. Representative calcium wave spreading is shown before (B) and after (C) ET treatment (scale bar 400 μm). (D) Relative propagation between two successive stimulations normalized to control condition (SN, $n = 8$; 10^{-7} M ET-1, $n = 16$; 10^{-4} M CBX, $n = 10$; 2×10^{-5} M 18α-GA, $n = 8$; 10^{-4} M ATP, $n = 8$). Whereas treatments with saline solution and ATP did not change the circular propagation of fluorescence upon subsequent electrical stimulations, it was significantly reduced by ET and two known gap junction uncoupling agents CBX and 18α-GA. Values are presented as mean of relative propagation ± SEM. *$P \leq 0.05$; **$P \leq 0.01$ and ***$P \leq 0.001$.

$P = 0.1195$) or OECs (two-tailed Mann–Whitney tests, $U_{14} = 54.00$, $P = 0.1293$). As OECs were more abundant on OM primary culture slides (see Gouadon *et al.*, 2010), and thereby more easily recordable, we extended our patch-clamp study on these cells. We first tested the effect of 18α-GA at 2.10^{-5} and 10^{-4} M, showing that 18α-GA dose-dependently increased the input response of OECs (two-tailed Mann–Whitney tests; 2.10^{-5} M: $U_5 = 6.00$, $P = 0.0133$; 10^{-4} M: $U_9 = 0.00$, $P = 0.0001$) (Fig. 4G). We next further explored which ET receptors could be involved in the input resistance change in OECs. In accordance with the result obtained in acute OM slices, the application of the ET_B agonist S6C did not change the input resistance of OECs (two-tailed Mann–Whitney tests, $U_6 = 16.00$, $P = 0.0679$). Moreover, the effect of ET-1 was significantly reduced in the presence of the selective ET_A antagonist BQ_{123} (two-tailed Mann–Whitney tests, $U_8 = 14.00$, $P = 0.0098$) (Fig. 4G). Overall, these results clearly suggest that ET-1 limited gap junctional communication between OM nNCs primarily through the ET_A receptor.

Gap junction uncoupling alone does not mimic the antiapoptotic effects of endothelin in olfactory mucosa primary culture

We had previously found that ET-1 could limit serum deprivation-induced apoptosis in OM primary culture, and gap junction uncoupling has been described to be neuroprotective in the central nervous system (Lin *et al.*, 2003). To test whether the ET-1 neuroprotective

FIG. 2. ET generates intracellular calcium rises in both OECs and SCs. (A) Schematic view of the OM slice presented in B–D (scale bar 100 μm). Differential interference contrast (DIC)/infrared (IR) (B) and epifluorescence images before (C), and after (D) ET-1 application. Magnified area outlined in dashed red (E) or dashed black (I) line (scale bar 25 μm). (F) Average time courses of the effects of 10^{-7} M ET-1, 10^{-7} M S6C and 10^{-4} M ATP stimulations (drug application 1 min; black line) on the calcium signal measured in the SCs containing the ROI ($\Delta F/F$ ± SEM; $n = 52$). (G) Time course of the effect of 10^{-7} M ET-1 on the calcium signal in a representative individual SC showing the increase in frequency of calcium transients after ET-1 application. (H) Evolution of calcium transient frequency after ET-1 application in SCs ($n = 6$ individual SCs). *$P \leq 0.05$. (J) Average time courses of the effects of 10^{-7} M ET-1, 10^{-7} M S6C and 10^{-4} M ATP stimulations (drug application 1 min; black line) on the calcium signal measured in OECs containing ROIs ($\Delta F/F$ ± SEM; $n = 72$). (K) Schematic view of the OB slice presented in L–N (scale bar 100 μm). ONL, Olfactory Nerve Layer. DIC/IR (L) and epifluorescence images before (M), and after ET-1 application (N). Magnified area outlined in dashed black line (O) (scale bar 25 μm). (P) Average time courses (± SEM) of the effects of 10^{-7} M ET-1 and 10^{-4} M ATP stimulations (drug application 1 min: black line) on the calcium signal measured in OECs containing ROIs ($\Delta F/F$ ± SEM; $n = 36$). ET-1 evokes average calcium responses of higher amplitudes than the ATP-evoked responses in the OECs in the bulb.

© 2014 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd

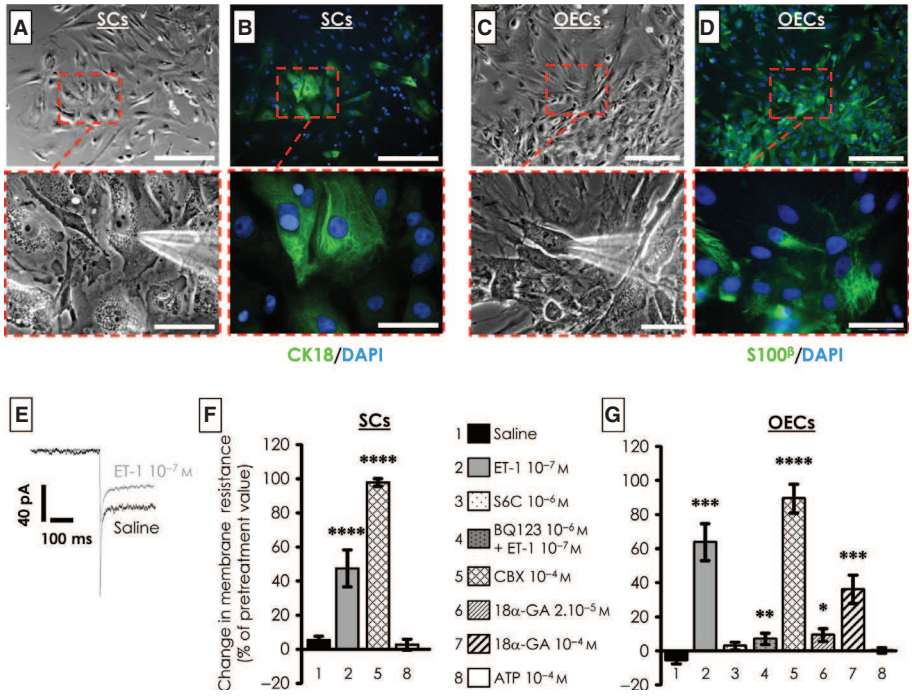


FIG. 4. ET increases the input resistance of both OECs and SCs in OM primary culture. The effects of ET and the gap junction uncoupling agent on the membrane properties of OECs and SCs in OM primary culture were monitored using patch-clamp recordings in whole-cell configuration. The specific morphologies of both types of cells are illustrated by phase-contrast images showing a representative SC (A) and OEC (C) (scale bar 200 μm). Magnified area outlined in dashed red line (scale bar 50 μm). The recorded cell identities were confirmed by posthoc immunocytochemistry directed against CK-18 (SCs) (B) and S100 calcium-binding protein β-subunit ($S100^{\beta}$) (OECs) (D). (E) Sample currents recorded in SCs in response to hyperpolarizing voltage steps from -60 mV (holding potential) to −80 mV, before (black) or after (grey) ET application. Changes of membrane resistance following drug application were monitored for SCs (F) and OECs (G). Changes of input resistances are expressed as a percentage of their values before the application of the drugs (mean ± SEM). (F) SCs: saline, $n = 8$; 10^{-7} M ET-1, $n = 18$; 10^{-4} M CBX, $n = 19$; 10^{-4} M ATP, $n = 13$. ****$P \leq 0.0001$. (G) OECs: saline, $n = 12$; 10^{-7} M ET-1, $n = 16$; 10^{-7} M S6C, $n = 8$; 10^{-7} M ET-1 + 10^{-6} M BQ_{123}, $n = 8$; 10^{-4} M CBX, $n = 21$; 2×10^{-5} M 18α-GA, $n = 5$; 10^{-4} M 18α-GA, $n = 9$; 10^{-4} M ATP, $n = 14$. *$P \leq 0.05$; **$P \leq 0.01$; ***$P \leq 0.001$ and ****$P \leq 0.0001$.

effect could be based on the gap junction uncoupling described above, we serum-deprived 10 day OM primary cultured cells, and co-treated them with either ET-1 or an increasing concentration of CBX. After 24 h, we evaluated the level of cellular death related to the percentage of released LDH in the extracellular medium. Whereas ET-1 significantly reduced the level of cellular death induced by serum deprivation (two-tailed Mann–Whitney tests, $U_{60} = 180.00$, $P < 0.0001$), CBX was ineffective at 10^{-6} M (two-tailed Mann–Whitney tests, $U_{60} = 380.00$, $P = 0.3590$) and 10^{-5} M (two-tailed Mann–Whitney tests, $U_{56} = 307.00$, $P = 0.2646$), and even increased the level of serum deprivation-induced cellular death at 10^{-4} M (two-tailed Mann–Whitney tests, U_{50}=49.00, $P < 0.0001$) (Fig. 5). It is of note that the same high concentration of CBX alone did not modify cellular survival in the control condition (two-tailed Mann–Whitney tests, $U_{49} = 186.00$, $P = 0.0985$).

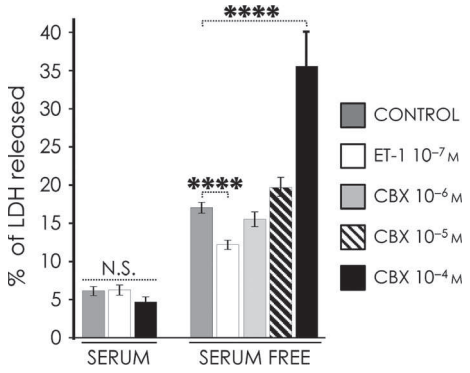


FIG. 5. Gap junction uncoupling is not sufficient to mimic the antiapoptotic effect of ET-1 in an OM primary culture. The cell death induced by serum deprivation in a 7 day OM primary culture consisting mainly of OECs and SCs was quantified by measuring the percentage of LDH released in the extracellular medium. Part of the primary culture was treated with control medium containing serum (SERUM), alone or mixed with 10^{-7} M ET-1 or 10^{-4} M CBX, or with serum-deprived medium (SERUM FREE), alone or supplemented with either 10^{-7} M ET-1 or increasing concentrations of CBX. Mean ± SEM ($n = 10$). ****$P \leq 0.0001$. No statistical difference was observed between control medium alone, or mixed with 10^{-7} M ET-1 or 10^{-4} M CBX. Similarly, no statistical difference was observed between serum-deprived medium alone, or supplemented with 10^{-6} or 10^{-5} M CBX.

Discussion

Endothelin 1 is produced and matured in the olfactory epithelium and strongly activates sustentacular cells and olfactory ensheathing cells in the olfactory mucosa

We had previously demonstrated that ET-1 could activate calcium signals in most nNCs and a small proportion of the neurons of an OM primary culture (Gouadon *et al.*, 2010). Here, we first confirmed by *in situ* hybridization that the ET system was indeed expressed in the OM and our results showed that it was massively present in basal cells and OSNs but also at a moderate level in SCs and olfactory nerve layer surrounding cells. Furthermore, although we had previously concluded, based on immunocytochemical and

pharmacological approaches in OM primary cultures, that ET_B was restricted to neuronal cells (OSNs) and ET_A to nNCs (SCs and OECs), we presently observed *in situ* that both receptors are more broadly expressed in the different OM cell types, with a stronger expression in OSNs. This discrepancy may be due to slight differences in the expression of the ET system *in vivo* and *in vitro*, as already reported for some markers used for the identification of OECs (as reviewed by Vincent *et al.*, 2005). The stronger expression in the neuronal cell layer of the OE was consistent with our previous study showing that ET-1 acts as a neuroprotective factor in this tissue (Laziz *et al.*, 2011). However, in accordance with our previous study, but in apparent contrast to this massive expression of the ET system in the neuronal cell layer, ET-1 failed to elicit evident neuronal calcium response in OM slices, except in very rare OSNs. This discrepancy may be due to the higher level of desensitization of ET receptors in OSNs. Indeed, ET receptors are known to be easily desensitized (Freedman *et al.*, 1997; Gartner *et al.*, 2013) and we observed *in vitro* that OM cells are desensitized up to 24 h following ET-1 stimulation (Gouadon *et al.*, 2010). If such desensitization also exists for ET receptors in the OM *in vivo*, one could reasonably assume that it may be stronger where Big-ET-1 and ECE are mostly expressed, i.e. neuronal and basal cell layers. An alternative explanation may be that the ET receptors expressed by OSNs are not related to the intracellular calcium signalization as many alternative transduction pathways have been described for ET receptors (Nabhen *et al.*, 2009).

In contrast, the strongest calcium responses to ET-1 in OM slices were observed in nNCs, where the ET system appeared to be more sparsely expressed, i.e., in the SC layer and in the lamina propria, around axon bundles. Moreover, in addition to the robust acute calcium increase generated by ET-1 in almost all of the SCs, we noticed the occurrence, in most of these cells, of spontaneous rhythmic calcium transients. Those activations do not lie on the ET_B receptor, as indicated by the ineffective application of the ET_B agonist S6C.

Hegg and co-workers previously reported intracellular and intercellular calcium oscillations in SCs of mice pup OM slices at a very low occurrence (~0.7% of OM slices) in control condition. The frequency of those calcium transients was increased in response to ATP stimulation (Hegg *et al.*, 2009), which subsequently exerted a neuroprotective and neuroproliferative action in the OE, through the calcium-dependent secretion of some neurotrophic factors by neurons, SCs and microvillar cells, like Neuropeptide Y (Kanekar *et al.*, 2009; Jia & Hegg, 2010; Lucero, 2013). As ET-1 also increased the calcium transient frequency in the SC layer, the neuroprotective effect of ET observed previously (Laziz *et al.*, 2011) could be indirectly mediated through a similar neuroprotective factor secretion by SCs.

Finally, the response observed around the axon bundles in OM slices may be related to OECs that are associated with axons of OSNs (Rieger *et al.*, 2007; Nakajima *et al.*, 2013). Indeed, although OECs in the OM express slightly different markers than OECs in the OB, both have been shown to be strongly sensitive to ET-1 (Vincent *et al.*, 2003; Gouadon *et al.*, 2010). We also observed very similar responses to ET-1 around axon bundles in the OM and in the olfactory nerve layer of the OB, i.e. a large calcium response, and a constrictive effect, that probably corresponds to the ET-1-induced morphological plasticity of OB OECs previously described *in vitro* (Vincent *et al.*, 2003).

Endothelin 1 acts as a gap junction uncoupling factor in the olfactory mucosa

Among the pleiotropic actions of ET-1, the uncoupling of gap junctions in glial cells has been described in different regions of the central nervous system (Giaume *et al.*, 1992; Blomstrand *et al.*, 2004). Although SCs are well described for their connections through gap junctions (Vogalis *et al.*, 2005), less is known about OECs in the OM (Barnett *et al.*, 2001; Rela *et al.*, 2010). In order to test whether ET-1 could also act as a gap junction uncoupling agent on SCs and OECs, we worked on a primary culture and performed two sets of experiments. We first examined the propagation of a calcium wave through gap junctions after an electrical stimulation. Such external stimulation will primarily directly activate the targeted cell(s) close to the tip of the stimulating electrode, which may in turn propagate calcium waves to the electrically coupled neighbouring cells (Venance *et al.* 1997). As expected, the intercellular calcium wave propagation was significantly reduced by ET-1 and two ascertained gap junction uncoupling agents, CBX and 18α-GA (Meme *et al.*, 2009). This reduction could not be ascribed to the ET-1-induced elevation of the calcium level, as ATP, which generates a broad intracellular calcium increase in the same OM primary culture cells, did not affect the propagation of a subsequent electrically-induced calcium wave. However, the reduction of the calcium wave propagation by ET-1 and the gap junction uncoupling agents was more limited (up to 25% for CBX) than expected from their reported effects on astrocytes. At least three possible explanations for this moderate effect can be proposed. Firstly, the majority of our primary culture cells are OECs, which have limited coupling compared with astrocytes (Barnett *et al.*, 2001; Rela *et al.*, 2010). Secondly, part of the observed calcium wave could directly come from the intracellular propagation of the calcium into the cytoplasmic extensions of the stimulated cell. This point is particularly critical with our OM primary culture, as many OECs largely spread out (Gouadon *et al.*, 2010). Finally, as previously shown, such stimulation may also trigger the release of paracrine active factors (Venance *et al.* 1997; Vogalis *et al.*, 2005; Rieger *et al.*, 2007). These propagation modalities are clearly not expected to imply gap junctional communication.

Although the cells affected were presumably OECs, as they represent the major part of the primary culture of the OM, we aimed to clearly identify the cellular type affected by ET-1. We thus monitored the effect of ET-1 on cellular input resistance by patch clamp (Blomstrand *et al.*, 2004), and performed posthoc identification by immunocytochemistry. Again, ET-1 but not ATP could mimic the elevation in cellular input resistance observed after CBX treatment, which would be expected if gap junction channels are successfully closed. This effect was present in both SCs and OECs. As OECs were more abundant on OM primary culture slides, and thereby more easily recordable, we also examined the dose-dependent effect of 18α-GA at 20 and 100 μM on those cells. The effect at low concentration was quite moderate and consistent with our observation on calcium wave propagation experiments. Similarly to CBX application, 18α-GA at 100 μM induced a strong increase of the input resistance of OECs. Both drugs are classically used as gap junction uncoupling agents, and the application of ET-1 (but not the ET_B agonist S6C) induced a similar input resistance increase, which was antagonized by an ET_A antagonist. The potency of the different drugs used is similar for both experiments. Furthermore, as there is no correlation between active drugs and their structure (i.e. steroid core for CBX and 18α-GA vs. small peptides for ET-1 and S6C), a direct membrane effect of the different molecules used is very unlikely. Overall, all of these results strongly indicate that ET-1 uncouples gap junctions in both cellular types, mainly through ET_A receptors.

We had previously shown that ET-1 acts as a survival factor in the OM (Laziz *et al.*, 2011) and gap junction uncoupling has been shown to limit cellular death in various studies (Wang *et al.*, 2012;

© 2014 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd

Beraki *et al.*, 2013). As we could not mimic the protective effect of ET-1 by CBX in our OM primary culture, it is likely that ET-1 probably acts at a different level in order to prevent cellular death. We also cannot totally rule out the possibility that ET-1 limits cellular cell death through gap junction uncoupling, as in some conditions CBX can also be toxic (Ozog *et al.*, 2002), which was the case for high concentrations in our conditions.

These results need to be confirmed *in vivo* with older animals and raise the question of whether ET-1, in addition to its neuroprotective action in the OM, could affect the detection of odorants through gap junction modulation as suggested previously (Zhang, 2010).

Author contributions

M.L.B., P.C. and N.M. designed and performed experiments, analysed data and wrote the article; S.R. and D.G. performed experiments. The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgements

This work was funded by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). M.L.B. is a recipient of a Ph.D. research fellowship from the Université d'Evry Val d'Essone (UEVE). We would like to thank Vincent Bombail for his help in improving the manuscript, Charles Sanson and Caroline Sezille for their help in some electrophysiological experiments, all laboratory members for fruitful discussions and the UEIERP (INRA, Jouy-en Josas) for animal care and treatments.

Abbreviations

18α-GA, 18α-glycyrrhetinic acid; ACSF, artificial cerebrospinal fluid; CBX, carbenoxolone; ECE, endothelin converting enzyme; ET, endothelin; LDH, lactate dehydrogenase; nNC, non-neuronal cell; OB, olfactory bulb; OE, olfactory epithelium; OEC, olfactory ensheathing cell; OM, olfactory mucosa; OSN, olfactory sensory neuron; P, postnatal day; PBS, phosphate-buffered saline; ROI, region of interest; S6C, Sarafotoxin 6C; SC, sustentacular cell.

References

Barber, P.C. & Lindsay, R.M. (1982) Schwann cells of the olfactory nerves contain glial fibrillary acidic protein and resemble astrocytes. *Neuroscience*, **7**, 3077–3090.

Barnett, S.C., Thompson, R.J., Lakatos, A. & Pitts, J. (2001) Gap junctional communication and connexin expression in cultured olfactory ensheathing cells. *J. Neurosci. Res.*, **65**, 520–528.

Beraki, S., Litrus, L., Soriano, L., Monbureau, M., To, L.K., Braithwaite, S.P., Nikolich, K., Urfer, R., Oksenberg, D. & Shamloo, M. (2013) A pharmacological screening approach for discovery of neuroprotective compounds in ischemic stroke. *PLoS One*, **8**, e69233.

Blomstrand, F., Venance, L., Siren, A.L., Ezan, P., Hanse, E., Glowinski, J., Ehrenreich, H. & Giaume, C. (2004) Endothelins regulate astrocyte gap junctions in rat hippocampal slices. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 1005–1015.

Chuah, M.I. & West, A.K. (2002) Cellular and molecular biology of ensheathing cells. *Microsc. Res. Techniq.*, **58**, 216–227.

Freedman, N.J., Ament, A.S., Oppermann, M., Stoffel, R.H., Exum, S.T. & Lefkowitz, R.J. (1997) Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J. Biol. Chem.*, **272**, 17734–17743.

Gartner, F., Seidel, T., Schulz, U., Gummert, J. & Milting, H. (2013) Desensitization and internalization of endothelin receptor A: impact of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2)-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **288**, 32138–32148.

Giaume, C., Cordier, J. & Glowinski, J. (1992) Endothelins inhibit junctional permeability in cultured mouse astrocytes. *Eur. J. Neurosci.*, **4**, 877–881.

Gouadon, E., Meunier, N., Grebert, D., Durieux, D., Baly, C., Salesse, R., Caillol, M. & Congar, P. (2010) Endothelin evokes distinct calcium transients in neuronal and non-neuronal cells of rat olfactory mucosa primary cultures. *Neuroscience*, **165**, 584–600.

Hegg, C.C., Greenwood, D., Huang, W., Han, P. & Lucero, M.T. (2003) Activation of purinergic receptor subtypes modulates odor sensitivity. *J. Neurosci.*, **23**, 8291–8301.

Hegg, C.C., Irwin, M. & Lucero, M.T. (2009) Calcium store-mediated signaling in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *Glia*, **57**, 634–644.

Jang, W., Lambropoulos, J., Woo, J.K., Peluso, C.E. & Schwob, J.E. (2008) Maintaining epitheliopoietic potency when culturing olfactory progenitors. *Exp. Neurol.*, **214**, 25–36.

Jia, C. & Hegg, C.C. (2010) NPY mediates ATP-induced neuroproliferation in adult mouse olfactory epithelium. *Neurobiol. Dis.*, **38**, 405–413.

Kanekar, S., Jia, C. & Hegg, C.C. (2009) Purinergic receptor activation evokes neurotrophic factor neuropeptide Y release from neonatal mouse olfactory epithelial slices. *J. Neurosci. Res.*, **87**, 1424–1434.

Laziz, I., Larbi, A., Grebert, D., Sautel, M., Congar, P., Lacroix, M.C., Salesse, R. & Meunier, N. (2011) Endothelin as a neuroprotective factor in the olfactory epithelium. *Neuroscience*, **172**, 20–29.

Lin, J.H., Yang, J., Liu, S., Takano, T., Wang, X., Gao, Q., Willecke, K. & Nedergaard, M. (2003) Connexin mediates gap junction-independent resistance to cellular injury. *J. Neurosci.*, **23**, 430–441.

Lucero, M.T. (2013) Peripheral modulation of smell: fact or fiction? *Semin. Cell Dev. Biol.*, **24**, 58–70.

Meme, W., Vandecasteele, M., Giaume, C. & Venance, L. (2009) Electrical coupling between hippocampal astrocytes in rat brain slices. *Neurosci. Res.*, **63**, 236–243.

Moon, C., Liu, B.Q., Kim, S.Y., Kim, E.J., Park, Y.J., Yoo, J.Y., Han, H.S., Bae, Y.C. & Ronnett, G.V. (2009) Leukemia inhibitory factor promotes olfactory sensory neuronal survival via phosphoinositide 3-kinase pathway activation and Bcl-2. *J. Neurosci. Res.*, **87**, 1098–1106.

Nabhen, S.L., Perfume, G., Battistone, M.A., Rossi, A., Abramoff, T., Bianciotti, L.G. & Vatta, M.S. (2009) Short-term effects of endothelins on tyrosine hydroxylase activity and expression in the olfactory bulb of normotensive rats. *Neurochem. Res.*, **34**, 953–963.

Nakajima, M., Tsuruta, M., Mori, H., Nishikawa, C., Okuyama, S. & Furukawa, Y. (2013) A comparative study of axon-surrounding cells in the two nasal nerve tracts from mouse olfactory epithelium and vomeronasal organ. *Brain Res.*, **1503**, 16–23.

Ozog, M.A., Siushansian, R. & Naus, C.C. (2002) Blocked gap junctional coupling increases glutamate-induced neurotoxicity in neuron-astrocyte co-cultures. *J. Neuropath. Exp. Neur.*, **61**, 132–141.

Pack, A.K. & Pawson, L.J. (2010) Neuroglial modulation in peripheral sensory systems. *Neuroscientist*, **16**, 342–348.

Rela, L., Bordey, A. & Greer, C.A. (2010) Olfactory ensheathing cell membrane properties are shaped by connectivity. *Glia*, **58**, 665–678.

Rieger, A., Deitmer, J.W. & Lohr, C. (2007) Axon-glia communication evokes calcium signaling in olfactory ensheathing cells of the developing olfactory bulb. *Glia*, **55**, 352–359.

Schwob, J.E. (2002) Neural regeneration and the peripheral olfactory system. *Anat. Rec.*, **269**, 33–49.

Thyssen, A., Hirnet, D., Wolburg, H., Schmalzing, G., Deitmer, J.W. & Lohr, C. (2010) Ectopic vesicular neurotransmitter release along sensory axons mediates neurovascular coupling via glial calcium signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 15258–15263.

Venance, L., Stella, N., Glowinski, J. & Giaume, C. (1997) Mechanism involved in initiation and propagation of receptor-induced intercellular calcium signaling in cultured rat astrocytes. *J. Neurosci.*, **17**, 1981–1992.

Venance, L., Premont, J., Glowinski, J. & Giaume, C. (1998) Gap junctional communication and pharmacological heterogeneity in astrocytes cultured from the rat striatum. *J. Physiol.*, **510**(Pt 2), 429–440.

Vincent, A.J., West, A.K. & Chuah, M.I. (2003) Morphological plasticity of olfactory ensheathing cells is regulated by cAMP and endothelin-1. *Glia*, **41**, 393–403.

Vincent, A.J., West, A.K. & Chuah, M.I. (2005) Morphological and functional plasticity of olfactory ensheathing cells. *J. Neurocytol.*, **34**, 65–80.

Vogalis, F., Hegg, C.C. & Lucero, M.T. (2005) Electrical coupling in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *J. Neurophysiol.*, **94**, 1001–1012.

Wang, Y., Song, J.H., Denisova, J.V., Park, W.M., Fontes, J.D. & Belousov, A.B. (2012) Neuronal gap junction coupling is regulated by glutamate and plays critical role in cell death during neuronal injury. *J. Neurosci.*, **32**, 713–725.

Zhang, C. (2010) Gap junctions in olfactory neurons modulate olfactory sensitivity. *BMC Neurosci.*, **11**, 108–123.

© 2014 Federation of European Neuroscience Societies and John Wiley & Sons Ltd