Deuxième partie

Position du problème

Les odeurs naturelles étant en général constituées d'un grand nombre de molécules odorantes, l'étude de la représentation des mélanges nous parait nécessaire à la compréhension du fonctionnement du système olfactif.

Pourtant, les seules connaissances disponibles sur la représentation olfactive des mélanges proviennent des études électrophysiologiques chez les non-mammifères d'une part, et des études de psychophysique chez l'homme d'autre part.

La question récurrente dans les études électrophysiologiques concerne la prédictibilité de la réponse au mélange à partir des réponses à ses composants. En effet, cette prédictibilité signifie une connaissance des lois de composition des représentations des composants dans un mélange, et donne donc un point de départ pour la compréhension du codage des stimuli naturels.

Les études de psychophysique s'intéressent à la perception par l'homme de l'intensité et de la qualité des mélanges d'odeurs. Là encore se pose le problème de la prédiction de la perception d'un mélange par un sujet connaissant la perception qu'il a de ses composants. L'autre question à laquelle tentent de répondre ces études est celle du codage "analytique" ou "synthétique" d'un mélange.

Nous nous proposons d'étudier la représentation neuronale des mélanges dans le bulbe olfactif de mammifère, et d'axer nos recherches sur les deux problématiques précédentes. Nous aborderons d'une part la question de la prédictibilité de la réponse au mélange. Nous adapterons d'autre part la problématique du codage "analytique" ou "synthétique" des mélanges à la représentation neuronale. Nous chercherons donc à savoir si des informations propres à chacun des composants du mélange sont présentes au niveau du bulbe olfactif, ou si elles laissent place à une information spécifique du mélange dans laquelle les composants n'apparaissent plus.

La différence primordiale entre cette étude et les précédents travaux d'électrophysiologie sur les mélanges est due au fait que l'olfaction du mammifère est intimement liée à son processus de respiration. Nous nous trouvons donc dans la nécessité de tenir compte du rythme respiratoire dans le mode de caractérisation de l'activité neuronale que nous adopterons.

Le premier problème abordé ici est celui du choix d'une description de l'activité neuronale adaptée à notre étude. Nous commencerons par caractériser l'activité des cellules mitrales par l'évolution de leur fréquence de décharge en 45 points du cycle respiratoire, comme cela a déjà été justifié dans la revue bibliographique. Nous chercherons ensuite à extraire de ce motif la description la plus adaptée à notre étude.

À partir de cette description, nous définirons la réactivité cellulaire aux différentes odeurs, et aborderons le problème de la prédictibilité de la réactivité au mélange à partir de la réactivité à ses composants.

Comme une cellule peut répondre à plusieurs odorants, et les discriminer au moyen de différents motifs temporels d'activité, la troisième problématique abordée sera celle de la composition, dans la réponse aux mélanges, des motifs évoqués par leurs composants. Nous serons amenés à mettre en place de nouvelles méthodes pour comparer ces motifs et étudier leur loi de composition dans les mélanges. Nous nous intéresserons à la prédictibilité du motif évoqué par un mélange à partir de ceux évoqués par ses composants, et à la présence d'une information propre à chaque composant dans la représentation du mélange.

Troisième partie

Matériel et méthodes

Chapitre 4

Acquisition et description des données

4.1 Préparation des animaux et enregistrement des cellules mitrales

Les données ont été acquises à partir de 149 cellules mitrales de 31 rats Wistar mâles pesant entre 250 et 450 g. Les expériences ont été menées en accord avec les directives du 24 novembre 1986 du Conseil de la Communauté Européenne sur le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire (86/609/EEC). Les animaux étaient anesthésiés par injection intrapéritonéale de 3ml/kg d'équithésine (mélange à base de pentobarbital et d'hydrate de chloral). Le niveau d'anesthésie était contrôlé par la régularité du rythme respiratoire et l'absence du réflexe de retrait de la patte arrière en réponse à un pincement du talon. Il était maintenu par des injections régulières de 0.2 ml d'équithésine. La température rectale était maintenue à 37 ± 1^{o}C par une couverture chauffante.

Le crâne était ouvert au-dessus du bulbe olfactif gauche, et les activités unitaires extracellulaires enregistrées grâce à une microélectrode de verre remplie de NaCl 2M et de bleu pontamine, d'impédance 15 à 20 MΩ. La pointe de la microélectrode était descendue jusqu'à la couche ventrale de cellules mitrales. Cette couche était repérée par sa profondeur, et grâce aux caractéristiques de l'activité des différentes cellules rencontrées lors de la descente. En cas d'incertitude, la position de la cellule était vérifiée par une étude histologique, après coloration iontophorétique au bleu pontamine obtenue en passant à travers l'électrode un courant de 2-5 μA pendant 15 mn (par périodes de 10 s). Les enregistrements commençaient lorsqu'une cellule mitrale avait été clairement isolée. L'activité respiratoire des rats était captée pendant l'expérience par un pont de thermistances placé à l'entrée de la narine droite.

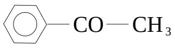
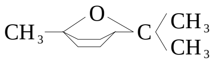
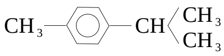
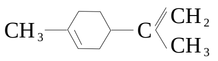
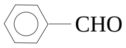
Pendant l'expérience, l'activité électrique cellulaire et le rythme respiratoire étaient enregistrés simultanément par l'intermédiaire du système d'acquisition CED-1401 Plus (Cambridge Electronic Design) pour un traitement différé. L'activité cellulaire était échantillonnée à 15 kHz, et la respiration à 1 kHz.

4.2 Stimulations odorantes

4.2.1 Choix des odorants

L'étude, par Sicard *et al.* [130], des similitudes de réponse électrophysiologique des neurorécepteurs olfactifs de la grenouille à différentes molécules odorantes leur a permis de définir des groupes qualitatifs d'odorants. D'un point de vue physico-chimique, ces groupes physiologiques correspondent majoritairement à des différences de volume molaire et de polarisabilité [79]. Les molécules odorantes utilisées ici ont été choisies dans différents groupes qualitatifs de manière à représenter au mieux l'espace des réponses physiologiques (*cf.* figure 4.1).

Les molécules utilisées systématiquement étaient l'acétophénone (abrégé par la suite en ACE ou A) qui se trouve dans le groupe des aromatiques, le cinéole (CIN ou C) dans le groupe des camphrés, le p-cymène (CYM ou P) dans le groupe des terpènes, et l'isoamyl-acétate (ISO ou I) et la méthyl-amyl-cétone (MAK ou M) parmi les chaînes linéaires. Les autres molécules susceptibles d'être utilisées étaient le butanol, le limonène, la 3-heptanone, la 4-heptanone, et le benzaldéhyde. Leurs formules moléculaires et pressions de vapeur saturante sont reportées dans le tableau 4.1.

Odeurs	Abréviations	Formules moléculaires	PVS (Pa)	Solubilité
Acétophénone	ACE (A)		49	0.55%
Cinéole	CIN (C)		260	<0.1%
Isoamyl acétate	ISO (I)	$\genfrac{}{}{0pt}{}{CH_3}{CH_3}\rangle CH-(CH_2)_2-O-CO-CH_3$	728	0.2%
p-Cymène	CYM (P)		190	<0.1%
Méthyl amyl-cétone	MAK (M)	$CH_3-(CH_2)_4-CO-CH_3$	490	0.43%
2-Butanol	BUT (B)	$CH_3-CH_2-CHOH-CH_3$	2320	15%
Limonène	LIM (L)		259	?
3-Heptanone	3-HEP (T)	$CH_3-(CH_2)_3-CO-CH_2-CH_3$	?	0.43%
4-Heptanone	4-HEP (Q)	$CH_3-(CH_2)_2-CO-(CH_2)_2-CH_3$	164	<0.1%
Benzaldéhyde	BZA (Z)		169	<0.1%

TAB. *4.1 : Nom et abréviation des 5 odorants principaux, et des 5 odorants suivants, leur formule, leur pression de vapeur saturante (PVS) et leur solubilité à 25°C. Toutes les valeurs de PVS sont issues de Handbook of Chemistry and Physics, 76^{th} edition ; celle de la 3-heptanone n'y figure pas pour une température de 25°C.*

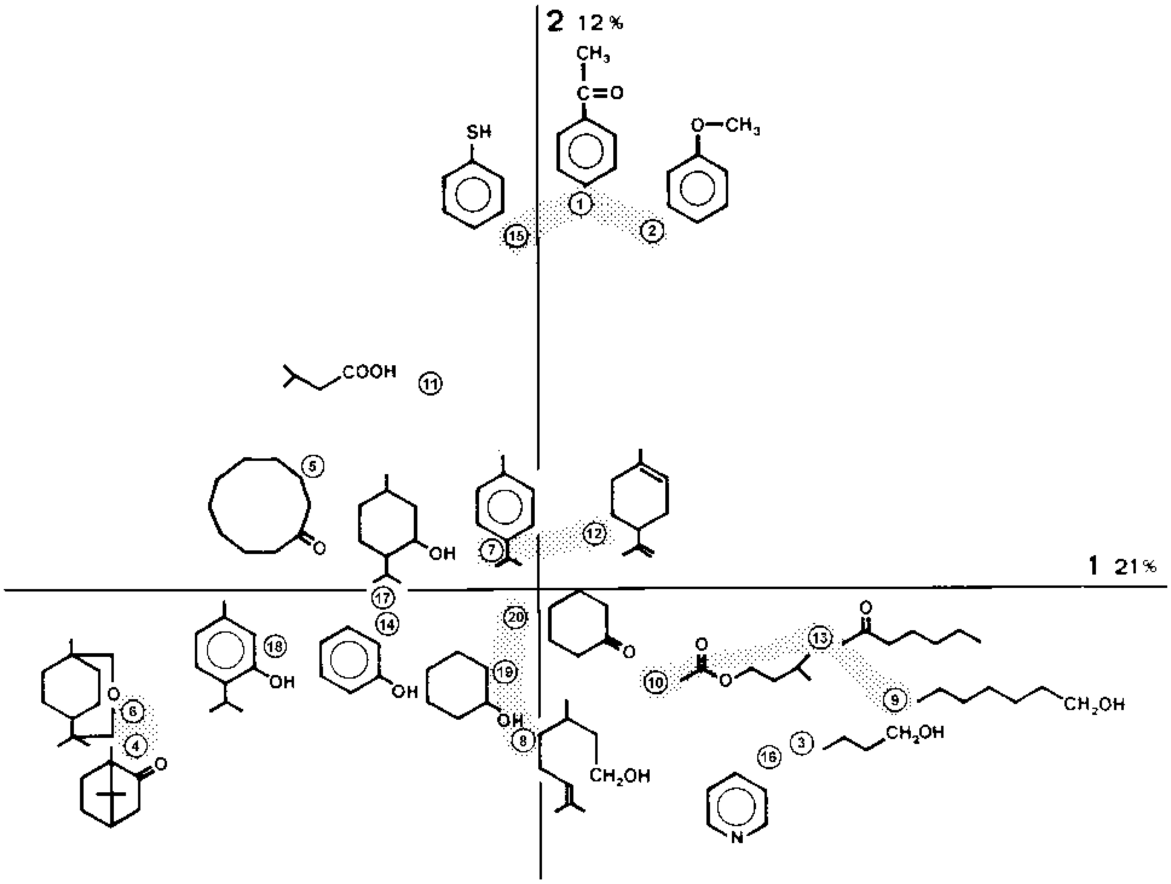


FIG. *4.1 : Représentation de vingt molécules odorantes sur les deux premiers axes de l'ACP réalisée dans l'espace des réponses (en termes d'intensité maximale de décharge) de 74 neurorécepteurs de l'épithélium olfactif de la grenouille. Le premier axe porte 21% de l'inertie et le deuxième 12%. La proximité des molécules odorantes dans les dimensions non représentées est figurée par des pointillés, et définit les groupes qualitatifs d'odorants. (1) acétophénone, (2) anisole, (3) n-butanol, (4) camphre, (5) cyclodécanone, (6) 1-8-cinéole, (7) p-cymène, (8) d-citronellol, (9) heptanol, (10) acétate d'isoamyl, (11) acide isovalérique, (12) limonène, (13) méthyl,amyl-cétone, (14) phénol, (15) thiophénol, (16) pyridine, (17) menthol, (18) thymol, (19) cyclohexanol, (20) cyclohexanone. Figure extraite de l'étude récapitulative de Sicard et al. [130].*

4.2.2 Protocole de stimulation

Les stimulations odorantes étaient délivrées pendant 10 secondes et espacées entre elles par la présentation d'au moins 60 secondes d'air pur. Pour chaque cellule, les stimulations consistaient dans un premier temps en la présentation de chacune des cinq odeurs pures, et de leurs dix mélanges binaires, puis éventuellement des cinq autres odeurs pures, et d'une partie des 35 autres mélanges binaires.

Dans les mélanges, chacun des deux composants était délivré à la même concentration que lors de sa présentation isolée. La concentration totale en molécules odorantes des mélanges était donc plus forte que celle des odeurs pures. Ce choix a été favorisé par rapport à celui d'une concentration totale constante dans le but de comparer la réponse au mélange avec les réponses aux deux composants. Certaines cellules pouvant changer de réponse selon la concentration d'un odorant, il aurait été plus délicat de comparer la réponse à un odorant pur avec la réponse à un mélange où il se trouve deux fois moins concentré.

Les molécules odorantes étaient délivrées par un olfactomètre à dilution de flux [137]. Cet olfactomètre permet de générer les mélanges de façon dynamique et de minimiser les interactions moléculaires entre composants. La sortie de l'olfactomètre est continuellement alimentée par un flux principal d'air pur (27 l/mn). Un second flux d'air pur (3 l/mn) injecté dans ce flux principal est remplacé au moment des stimulations par un flux identique d'air odorisé. L'air odorisé est obtenu par addition dans un flux d'air pur d'un flux faible et ajustable de la vapeur saturante contenue dans chacun des deux sacs en Tedlar branchés sur ce flux d'air pur. Pour réaliser des mélanges, les deux sacs contenaient chacun un odorant différent à pression de vapeur saturante. Pour les odeurs pures, l'un des deux sacs ne contenait que de l'air désodorisé.

Deux séries d'expériences ont été réalisées. Dans la première, chaque odorant est toujours présenté à une même concentration. Dans la deuxième, la réponse de chaque cellule est enregistrée pour plusieurs concentrations du même odorant. Les concentrations des molécules odorantes sont exprimées ici en termes de pression partielle (Pp), qui est le produit de sa pression de vapeur saturante (PVS) par le taux de dilution d qui lui est appliqué :

$$Pp = d.PVS$$

En admettant que l'air pur et les molécules odorantes utilisées se comportent comme des gaz parfaits, on passe de la pression partielle Pp à la concentration molaire C grâce à l'équation suivante :

$$C = \frac{n}{V} = \frac{Pp}{R.T}$$

où T est la température de la salle d'expérimentation (environ 20^{o}C), et R la constante des gaz parfaits ($R \simeq 8.3$ J.K^{-1}.mol^{-1}).

4.2.3 Expériences à concentration fixe

Dans une première série d'expériences, chaque odorant n'était utilisé qu'à une seule concentration, identique d'une cellule sur l'autre, et dans les conditions où il était délivré pur ou en mélange. Dans une première expérience, les odorants étaient tous utilisés à la même fraction de leur pression de vapeur saturante, tandis que dans une deuxième expérience, ils étaient délivrés à la même concentration molaire.

Dans l'**expérience 1**, les odorants étaient délivrés à une même dilution (2.10^{-2}) de leur vapeur saturante. Les pressions de vapeur saturante étant variables, les concentrations molaires appliquées étaient différentes d'un odorant à l'autre (*cf.* tableau 4.2, expérience 1).

Cette expérience concernait 63 cellules. Toutes ont été enregistrées hors stimulation et sous stimulation avec les cinq odeurs pures principales. Chacun des dix mélanges binaires correspondants a pu être délivré à un nombre de cellules variant de 41 à 54. Les cinq odeurs pures suivantes, ainsi que certains de leurs mélanges binaires, ont été testés sur 19 cellules.

		expérience 1		expérience 2	
Odeurs	PVS (Pa)	dilution d	Pp (Pa)	dilution d	Pp (Pa)
ACE	49	$2 * 10^{-2}$	0.98	$6.0 * 10^{-2}$	2.9
CIN	260	$2 * 10^{-2}$	5.2	$1.1 * 10^{-2}$	2.9
ISO	728	$2 * 10^{-2}$	14.6	$4.0 * 10^{-3}$	2.9
CYM	190	$2 * 10^{-2}$	3.8	$1.5 * 10^{-2}$	2.9
MAK	490	$2 * 10^{-2}$	9.8	$6.0 * 10^{-3}$	2.9
BUT	2320	$2 * 10^{-2}$	46.4		
LIM	259	$2 * 10^{-2}$	5.2		
3-HEP	?	$2 * 10^{-2}$	?		
4-HEP	164	$2 * 10^{-2}$	3.3		
BZA	169	$2 * 10^{-2}$	3.4		

TAB. *4.2 : Pression de vapeur saturante (PVS), taux de dilution appliquée et concentration finale en termes de pression partielle (Pp) de chacun des odorants. La Pp est le produit de la PVS par le taux de dilution.*

Dans l'**expérience 2**, nous avons choisi d'égaliser la concentration molaire de tous les odorants grâce à des dilutions *ad hoc* de leur vapeur saturante (*cf.* tableau 4.2, expérience 2). Tous les odorants étaient donc délivrés à une pression partielle de 2.9 Pa, qu'ils soient présentés purs, ou dans un mélange binaire.

Cette expérience concernait 86 cellules. Toutes ont été enregistrées hors stimulation et sous stimulation avec les cinq odeurs pures principales. Chacun des dix mélanges binaires correspondants a pu être délivré à un nombre de cellules variant de 52 à 61. Aucune des odeurs suivantes n'a été testée sur ces cellules. Certaines d'entre elles ont en revanche été soumises à l'expérience à concentration variable.

4.2.4 Expérience à concentration variable

Pour étudier l'effet de la concentration, nous avons enregistré l'activité de certaines cellules de l'expérience 2 sous stimulation avec un gamme de concentrations d'un odorant, et avec les mélanges correspondants de cet odorant et d'une autre molécule, dont la concentration restait fixe. La gamme de concentrations utilisable pour chaque odorant était définie par les dilutions que nous permettait l'olfactomètre. Les dilutions applicables étaient $4{*}10^{-3}$, $6{*}10^{-3}$, $1.1{*}10^{-2}$, $1.5{*}10^{-2}$ et $6.0{*}10^{-2}$. Les gammes de concentrations étaient donc différentes d'un odorant à l'autre. Elles sont indiquées dans le tableau 4.3, ainsi que les rapports des concentrations des deux odorants dans les mélanges.

Cette expérience a été réalisée en faisant varier la concentration relative des odorants d'un total de 61 mélanges, répartis sur 36 cellules de l'expérience 2.

odeur			A	C	I	P	M
	dilution		$6.0 * 10^{-2}$	$1.1 * 10^{-2}$	$4.0 * 10^{-3}$	$1.5 * 10^{-2}$	$6.0 * 10^{-3}$
		Pp (Pa)	2.90	2.90	2.90	2.90	2.90
A	$4.0 * 10^{-3}$	0.19		0.06		0.06	0.06
	$6.0 * 10^{-3}$	0.29		0.1	0.1	0.1	
	$1.1 * 10^{-2}$	0.53			0.18	0.18	0.18
	$1.5 * 10^{-2}$	0.72		0.25	0.25		0.25
	$6.0 * 10^{-2}$	2.90		1	1	1	1
C	$4.0 * 10^{-3}$	1.05	0.36			0.36	0.36
	$6.0 * 10^{-3}$	1.58	0. 45		0. 45	0. 45	
	$1.1 * 10^{-2}$	2.90	1		1	1	1
	$1.5 * 10^{-2}$	3.95	1.36		1.36		1.36
	$6.0 * 10^{-2}$	16.08			5.45	5.45	5.45
I	$4.0 * 10^{-3}$	2.90	1	1		1	1
	$6.0 * 10^{-3}$	4.35	1.5	1.5		1.5	
	$1.1 * 10^{-2}$	7.97	2.75			2.75	2.75
	$1.5 * 10^{-2}$	10.87	3.75	3.75			3.75
	$6.0 * 10^{-2}$	43.50		15		15	15
P	$4.0 * 10^{-3}$	0.78	0.27	0.27			0.27
	$6.0 * 10^{-3}$	1.16	0.4	0.4	0.4		
	$1.1 * 10^{-2}$	2.12	0.73		0.73		0.73
	$1.5 * 10^{-2}$	2.90	1	1	1		1
	$6.0 * 10^{-2}$	11.60		4	4		4
M	$4.0 * 10^{-3}$	1.90	0.67	0.67		0.67	
	$6.0 * 10^{-3}$	2.90	1	1	1	1	
	$1.1 * 10^{-2}$	5.31	1.83		1.83	1.83	
	$1.5 * 10^{-2}$	7.25	2.5	2.5	2.5		
	$6.0 * 10^{-2}$	29.00		10	10	10	

TAB. *4.3 : Représentation des gammes de concentrations applicables pour chaque odorant (colonne 3), et des rapports de concentration (colonnes 4 à 8) correspondants pour chaque paire d'odorants.*

4.3 Extraction des motifs temporels en 45 dimensions

Nous avons choisi de caractériser l'activité d'une cellule mitrale par son motif temporel de décharge au cours du cycle respiratoire. Nous commençons donc par extraire de l'activité brute de chaque cellule, en réponse à chaque stimulation, un motif en 45 dimensions qui constituera la description de base pour cette étude.

Traitement du signal neuronal

L'activité électrique cellulaire, échantillonnée et stockée à 15 kHz pendant l'expérience, est traitée ultérieurement à l'aide du logiciel Spike2 (Cambridge Electronic Design).

Dans un premier temps, nous vérifions la stabilité morphologique des potentiels d'action (PA) qui sont supposés avoir été générés par une même cellule. Tous les signaux où les PA changent de forme au cours de l'enregistrement sont éliminés, car ces PA sont susceptibles d'avoir été générés par deux cellules différentes.

Ensuite, pour chaque stimulation, les dates de déclenchement des PA sont extraites du signal pendant les 30 s précédant la stimulation et les 10 s de stimulation.

La figure 4.2 donne un exemple de signal brut (activité électrique cellulaire et respiration), enregistré lors d'une stimulation odorante, ainsi que l'extraction des PA qui en découle. Une réorganisation temporelle de l'activité électrique au cours du cycle respiratoire est déjà visible sous stimulation sur ces données brutes. La suite du traitement a pour but de caractériser cette organisation temporelle avant et pendant stimulation.

Traitement du signal respiratoire

Parallèlement, le rythme respiratoire échantillonné à 1 kHz est traité de manière à extraire les dates des transitions entre la fin de chaque expiration et le début de l'inspiration suivante. Ce découpage du rythme respiratoire en cycles permet de représenter l'activité des neurones en fonction de l'instant du cycle auquel elle correspond. C'est ce qui est fait dans le "raster plot" de la figure 4.3 où les segments du train de PA correspondant aux différents cycles respiratoires sont représentés les uns sous les autres. Ce type de représentation permet de voir si l'activité neuronale est répartie régulièrement au cours du cycle. Dans l'exemple présenté, l'activité spontanée est répartie uniformément, tandis que l'activité sous stimulation est concentrée autour de la transition inspiration/expiration.

Chaque cycle respiratoire ainsi isolé, dont la durée moyenne est d'environ 0.5 s chez le rat anesthésié, est ensuite découpé en 45 intervalles de temps égaux (ou bins) d'une durée de 10 ms environ, dans le but de construire les motifs temporels.

Construction des motifs temporels

Les motifs sont construits en moyennant le nombre de PA par bin sur tous les cycles respiratoires entièrement compris dans l'intervalle de temps correspondant à une même condition expérimentale.

Le **motif évoqué** (ou EV) est construit en moyennant le nombre de PA par bin sur tous les cycles compris dans les 10 s de stimulation.

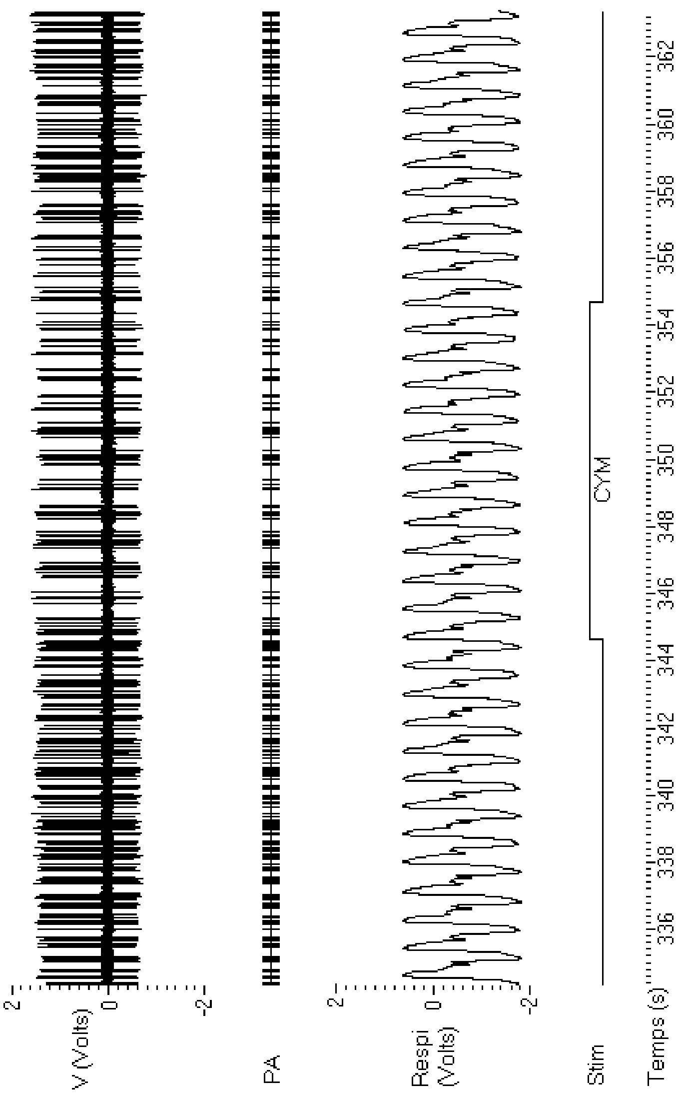


FIG. *4.2 : Un exemple de données brutes. Les lignes 1 et 3 (V et Respi) représentent respectivement l'activité électrique cellulaire et la respiration enregistrées pendant l'expérience. La ligne 4 (Stim) indique la période de stimulation, et la ligne 5 (Temps) le temps écoulé depuis le début de l'enregistrement. La ligne 2 (PA) représente la première étape du traitement du signal : l'extraction des PA de l'activité électrique, après vérification de leur stabilité. L'activité électrique étant échantillonnée à 15 kHz, cette étape permet de réduire très fortement la taille des données.*

Le **motif spontané** (ou SP) est construit en moyennant le nombre de PA par bin sur tous les cycles compris dans les 30 s précédant la stimulation : *cf.* figure 4.3.

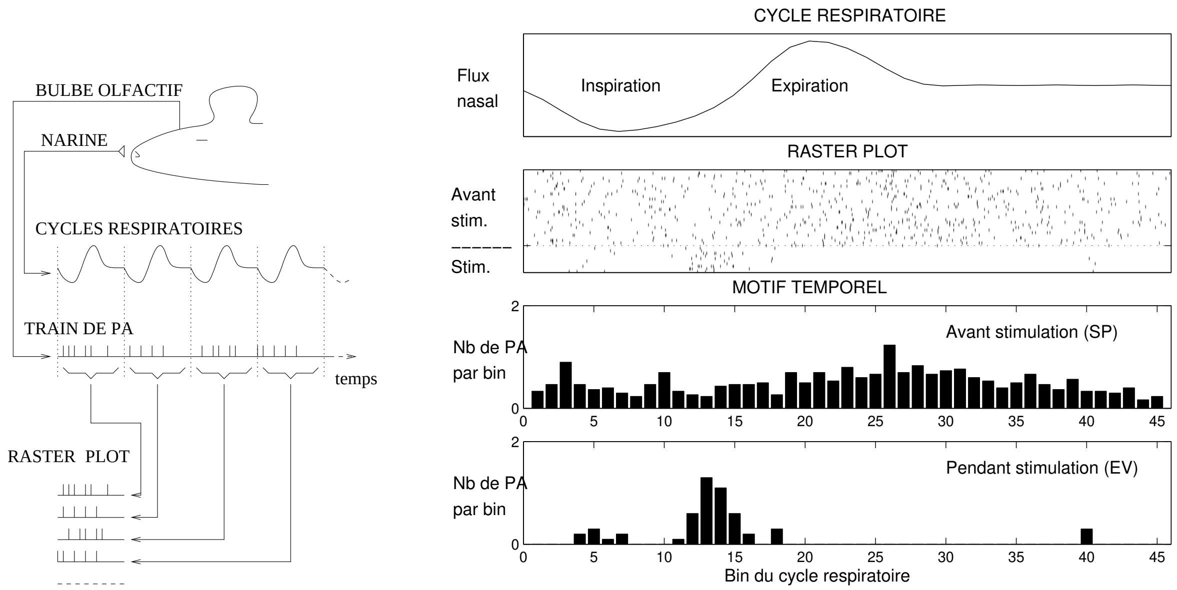


FIG. *4.3 : À gauche : Enregistrement simultané des cycles respiratoires et d'un train de potentiels d'action d'une cellule mitrale. Le raster plot est obtenu en représentant les uns sous les autres les segments du train de PA correspondant à chaque cycle respiratoire. À droite : Représentation d'un cycle respiratoire moyen, d'un raster plot enregistré 30 s avant et 10 s pendant la stimulation, et de deux motifs temporels obtenus en calculant pour chacun des 45 bins le nombre moyen de PA contenus dans ce bin sur tous les cycles avant et pendant la stimulation.*

Cette construction est validée par les deux observations suivantes :

- d'une part, le motif temporel de décharge sous stimulation se maintient de cycle en cycle dans la majorité des cas pendant les dix premières secondes de stimulation, ce qui autorise à sommer l'activité sur tous les cycles ;
- d'autre part, l'imprécision dans la détermination de la transition entre l'inspiration et l'expiration est largement plus faible que la taille des bins choisis. Cela exclut la possibilité d'un décalage des motifs par la méthode de construction.

La figure 4.4 illustre l'activité d'une cellule sous stimulation avec les 5 odeurs pures principales et leurs 10 mélanges binaires, représentée par les motifs temporels.

4.4 Réduction des dimensions de description

L'activité d'une cellule mitrale en réponse à un stimulus est caractérisée par son motif temporel de décharge au cours du cycle respiratoire en 45 dimensions. Nous ne considérerons donc plus les informations temporelles plus fines que celles contenues dans cette description de base, mais nous serons régulièrement amenés à extraire de ces motifs d'autres

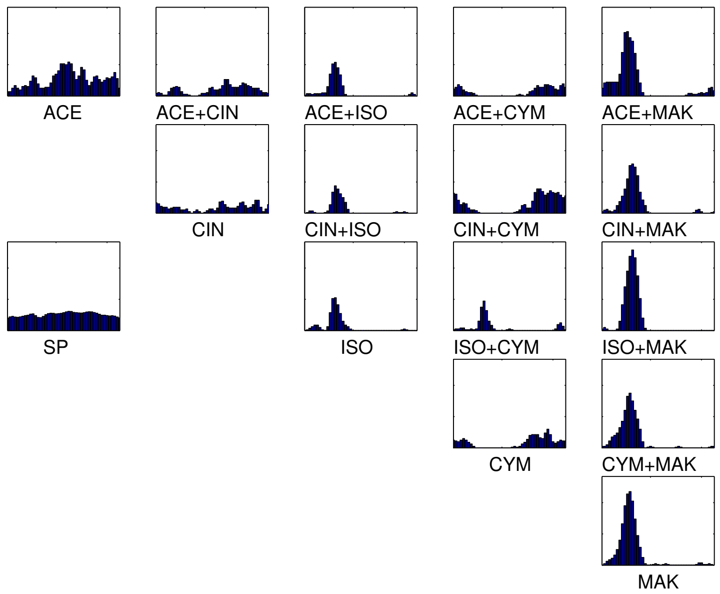


FIG. *4.4 : Un exemple de cellule avec les motifs temporels caractérisant l'activité spontanée moyenne et l'activité évoquée par chacune des 15 stimulations. Les motifs évoqués par les odeurs pures se trouvent sur la diagonale, les motifs évoqués par les mélanges à l'intersection de la ligne et de la colonne occupées par leurs composants, et le motif spontané moyen est représenté en bas à gauche (SP).*

descriptions constituées d'un nombre inférieur de dimensions. Ces réductions de dimension seront utilisées :

- soit pour les comparer à la description de départ dans le but de choisir la description la plus pertinente ;
- soit, si elles ont une signification physiologique, pour déterminer leur degré de corrélation avec certains des phénomènes observés.

4.4.1 Réduction de la fréquence d'analyse

Le nombre de dimensions des motifs temporels est réduit dans un premier temps en diminuant le nombre de bins utilisés pour découper le cycle respiratoire (c'est-à-dire la fréquence d'analyse). Cette réduction est réalisée à partir du motif à 45 bins par addition du contenu des bins adjacents 3 par 3 ou 5 par 5. Cela permet d'obtenir des motifs dont la fréquence d'analyse est de 45, 15, 9, 5, 3 ou 1 bin(s) par cycle respiratoire, et dont la taille des bins vaut environ 10 ms, 30 ms, 50 ms, 90 ms, 150 ms ou 0.5 s respectivement. Réduire la fréquence d'analyse à un seul bin par cycle respiratoire revient à calculer l'intensité moyenne de décharge sur un cycle respiratoire.

4.4.2 Analyse en Composantes Principales

Nous réduisons dans un deuxième temps le nombre de dimensions des motifs temporels en les projetant sur les N premiers axes définis par une Analyse en Composantes Principales (ACP). Cette ACP a été réalisée sur l'ensemble des motifs, spontanés et évoqués, extraits de l'activité des 149 cellules.

Brièvement, l'ACP est une méthode qui propose un nouvel espace de description où chaque dimension est une combinaison linéaire des dimensions de départ ; la première dimension étant la plus “représentative” des données, et chaque suivante la plus “représentative” orthogonale à toutes les précédentes. Le critère de représentativité que nous choisissons ici est la maximisation de la variance des données. Les vecteurs directeurs des nouvelles dimensions sont alors les vecteurs-propres de la matrice de variance-covariance des données, et leur degré de représentativité (variance des données dans cette dimension) est donné par les valeurs-propres associées.

Cette technique a donc l'avantage de sélectionner, parmi les combinaisons linéaires des dimensions de départ, les dimensions les plus représentatives des motifs temporels dont nous disposions, mais aussi de nous donner leur degré de représentativité.

4.4.3 Paramétrisation des motifs temporels

La réduction de la fréquence d'analyse et l'ACP ne permettent de sélectionner que des combinaisons linéaires des dimensions de départ. La réduction de dimension des motifs est donc complétée dans un troisième temps par l'extraction de paramètres scalaires plus complexes. Ces paramètres sont choisis arbitrairement parce qu'ils sont porteurs d'une signification physiologique ou parce qu'ils permettent de décrire simplement le motif temporel (*cf.* figure 4.5).

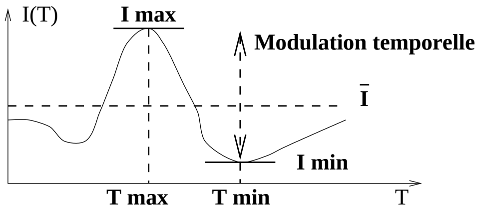


FIG. *4.5 : Paramétrisation d'un motif temporel : intensité moyenne ($\overline{I}$), minimale (I min) et maximale (I max) de décharge, position temporelle des décharges minimale (T min) et maximale (T max), et modulation temporelle.*

Les paramètres suivants seront utilisés par la suite pour décrire un motif temporel :

- son intensité moyenne de décharge, paramètre atemporel qui correspond à la somme des PA contenus dans les 45 bins, donc à l'étape extrême de la réduction de la fréquence d'analyse ;
- ses intensités maximale et minimale ;
- la position temporelle des intensités maximale et minimale ;
- un paramètre représentatif de sa modulation temporelle, comme l'écart-type du motif, ou encore le rapport du maximum sur la moyenne de son autocorrélation (*cf.* figure 4.6) ;
- et enfin les premiers coefficients de Fourier. Les coefficients de Fourier sont indicatifs de l'énergie contenue dans le motif pour chaque fréquence de modulation multiple de la fréquence respiratoire.

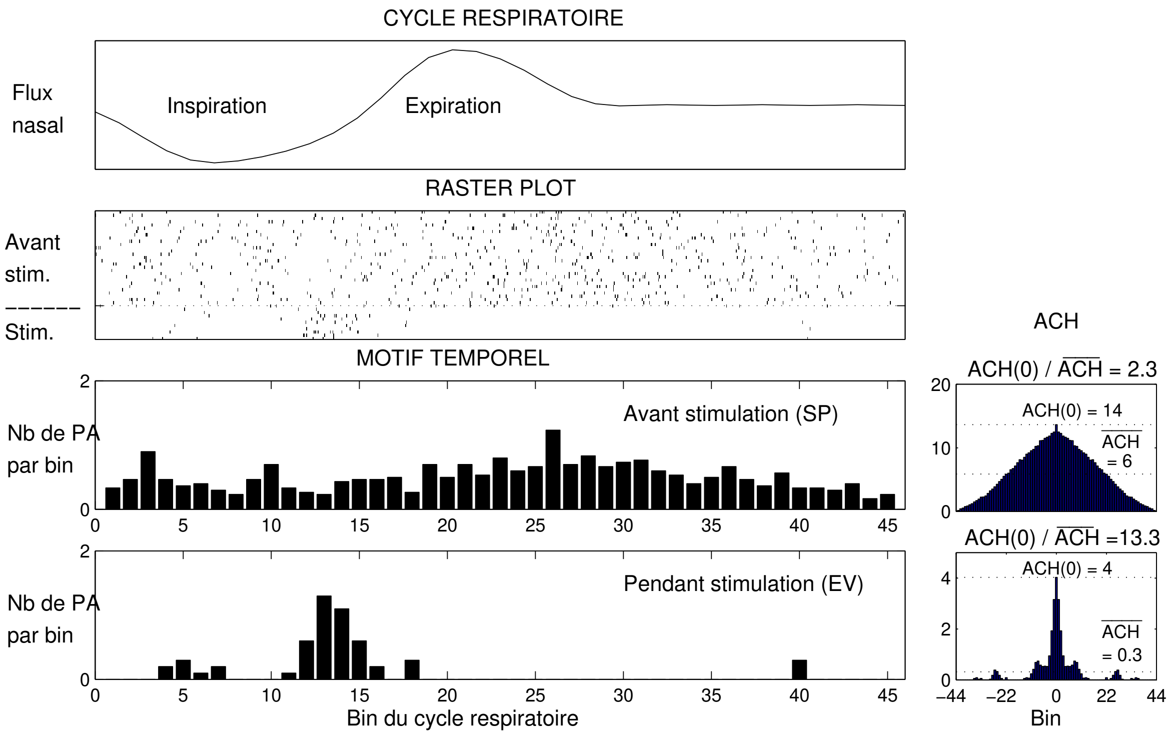


FIG. *4.6 : Représentation de l'autocorrélogramme (ACH) de deux motifs temporels. L'autocorrélogramme d'un signal se calcule par convolution de ce signal et de son symétrique. Lorsque le motif ne présente aucune modulation temporelle (motif du haut), le maximum de l'autocorrélogramme (ACH(0)) diffère peu de sa moyenne (* $\overline{ACH}$ *). Le facteur ACH(0) /* $\overline{ACH}$ *vaut 2.3 dans l'exemple présenté ici. En revanche, lorsque le motif est organisé dans le temps (motif du bas), la valeur maximale de l'autocorrélogramme se détache fortement de sa moyenne (facteur 13.3 ici). Le rapport ACH(0) /* $\overline{ACH}$ *sera utilisé par la suite pour caractériser l'amplitude de la modulation temporelle des motifs.*

Chapitre 5

Comparaison des motifs temporels

Les motifs temporels ont été choisis pour décrire l'activité cellulaire spontanée (motif spontané) et évoquée par chacune des stimulations odorantes (motifs évoqués). Pour étudier la représentation neuronale des mélanges, ces motifs doivent pouvoir être comparés entre eux. Jusqu'à présent, cette comparaison a été majoritairement réalisée visuellement. Nous présentons ici la comparaison visuelle, puis trois méthodes originales de comparaison automatique des motifs temporels. Ces méthodes sont évaluées, lorsqu'elles génèrent une décision, par rapport à la comparaison visuelle de référence (*cf.* Principe d'évaluation de tests de décision, Annexe B). Cette évaluation n'étant pas l'objectif principal de la thèse, ses résultats sont présentés dans ce chapitre.

Les deux premières méthodes automatiques (la classification hiérarchique ascendante, et la comparaison probabiliste) sont responsables d'une décision binaire quant à la différence entre deux motifs. Ces décisions seront utilisées par la suite pour définir deux notions fondamentales :

- la **réactivité** d'une cellule : on dira qu'une cellule est réactive à un odorant lorsque le motif évoqué par cet odorant est significativement différent du motif spontané ;
- le **pouvoir de discrimination** d'une cellule : on définira la capacité d'une cellule à discriminer deux odorants par la significativité de la différence entre les motifs évoqués par ces deux odorants.

Pour chaque cellule, nous disposons d'autant de répétitions du SP qu'il a été fait de stimulations odorantes différentes. Cela nous permet de connaître la variabilité du motif temporel, et de calculer un SP moyen. Les motifs évoqués ne sont quant à eux disponibles qu'en un seul exemplaire. Nous tiendrons systématiquement compte de cette asymétrie entre SP et EV pour leur comparaison.

La troisième méthode automatique décrite ici, la décomposition linéaire du mélange sur ses composants, est complémentaire des précédentes. Elle ne génère pas de décision binaire quant à la différence entre deux motifs, mais fournit un indicateur continu de la ressemblance du motif du mélange avec ceux de chacun de ses composants. Elle sera utilisée pour déterminer une loi de composition des motifs dans les mélanges.

5.1 Comparaison visuelle de référence

La toute première comparaison des paires de motifs temporels a été établie visuellement par deux observateurs différents, comme dans les études antérieures réalisées par notre équipe [25, 16, 22]. Elle servira de référence pour évaluer les méthodes automatiques suivantes. Il était demandé à chaque observateur de décider :

- d'une part, si un EV était significativement différent de l'ensemble des motifs spontanés disponibles ;
- d'autre part, si deux EV étaient significativement différents l'un de l'autre.

Les classifications des deux observateurs donnent les mêmes résultats dans 69 % des cas pour la première comparaison, et 75 % des cas dans la deuxième. Les taux d'accord relatifs, dont le calcul est présenté Annexe B, sont détaillés dans le tableau 5.1.

Comparaison SP/EV		Observateur 2 motifs identiques (49%)	Observateur 2 motifs différents (51%)	taux d'accord
Observateur 1	motifs identiques (28%)	234	46	84 %
	motifs différents (72%)	264	462	64 %
	taux d'accord	47 %	91 %	69%

Comparaison EV/EV		Observateur 2 motifs identiques (57%)	Observateur 2 motifs différents (43%)	taux d'accord
Observateur 1	motifs identiques (49%)	539	119	82 %
	motifs différents (51%)	224	468	68 %
	taux d'accord	71 %	80 %	75 %

TAB. *5.1 : Résultats de la comparaison visuelle par deux observateurs différents (Observateur 1 et Observateur 2) des motifs évoqués avec les motifs spontanés correspondants (SP/EV) et des couples de motifs évoqués (EV/EV).*

Si tous les taux d'accord relatifs sont bons pour la comparaison EV/EV, un des taux de la comparaison SP/EV est faible (47%). Ceci provient de la plus forte tendance de l'observateur 1 à considérer un EV comme différent du SP (72 % contre 51 % pour l'observateur 2). À cette différence de sensibilité près, les classifications des deux observateurs sont relativement proches. Elles serviront de base pour évaluer les résultats des autres méthodes.

5.2 Classification hiérarchique ascendante

La première méthode automatique que nous ayons utilisée pour comparer les motifs temporels est la classification hiérarchique ascendante. Elle consiste à choisir une métrique (la définition d'une distance) pour calculer la distance entre les motifs, puis à construire une typologie (une partition) de l'ensemble des motifs d'activité d'une même cellule de façon à regrouper au mieux les motifs les plus proches.

5.2.1 Choix de la distance

La première étape de cette méthode consiste à calculer toutes les distances paire à paire entre les différents motifs d'activité d'une même cellule.

Parmi les distances les plus classiques utilisables pour comparer deux objets multidimensionnels X et Y, comme nos deux motifs temporels, nous avons choisi la distance de Camberra pour les raisons suivantes :

- les distances comme celle de Tchebychev ($d(X,Y) = \max_i |X(i) - Y(i)|$), qui privilégient une coordonnée sur les autres, ne seront pas utilisées pour comparer les motifs de décharge car une différence d'activité importante, mais distribuée sur tous les bins, passerait inaperçue ;
- la distance de Manhattan ($d(X,Y) = \sum_i |X(i) - Y(i)|$), et la très classique distance euclidienne ($d(X,Y) = \sqrt{\sum_i (X(i) - Y(i))^2}$), correspondent respectivement à la somme des écarts, et à la racine de la somme des carrés des écarts. Ce sont deux cas particuliers des r-distances de Minkowsky ($d(X,Y) = (\sum_i |X(i) - Y(i)|^r)^{1/r}$). Ces métriques ne peuvent nous être utiles pour comparer des fréquences de décharge car elles donnent la même importance à une différence de 10 PA, que ce soit sur un total de 10 ou de 100 PA. Les bins les plus riches en PA vont donc avoir plus de poids, pour un même pourcentage de variation, que les bins où la fréquence est plus faible ;
- les distances normalisées nous semblent les plus adaptées. La normalisation peut se faire par la différence entre la valeur maximale et minimale que peut prendre chaque coordonnée (pour une même cellule), mais ces valeurs dépendent trop du nombre de motifs disponibles pour chaque cellule, qui est très variable dans notre cas. Nous utiliserons la distance de Camberra ($d(X,Y) = \sum_i \frac{|X(i)-Y(i)|}{X(i)+Y(i)}$) qui somme des taux de variation. Elle nous a paru la plus adaptée bien qu'elle donne la même importance à une variation de 1 PA sur 2 PA ou de 50 PA sur 100 ;
- quant aux distances de corrélation, nous ne les utiliserons pas non plus pour comparer des motifs temporels, car elles ne tiennent aucun compte de l'intensité moyenne de décharge.

5.2.2 Construction et troncature des dendrogrammes

La deuxième étape de la méthode consiste à représenter au mieux toutes les distances paire à paire entre les motifs par un arbre dont les feuilles sont les motifs temporels et les branches sont représentatives des distances entre motifs (un dendrogramme).

La figure 5.1 montre un exemple de dendrogramme obtenu pour la cellule dont les motifs sont représentés dans la figure 4.4.

Le dendrogramme est construit par une méthode ascendante partant d'un nombre de classes égal au nombre de motifs, et regroupant à chaque itération sous un même nœud les deux classes de motifs les plus proches. La proximité entre deux groupes peut s'estimer de différentes façons, par exemple avec le minimum, le maximum, ou encore la moyenne des distances entre tous les couples possibles de motifs appartenant chacun à un des deux groupes. Elle est déterminée ici par la méthode de Ward : le regroupement de deux classes se fait de manière à minimiser la nouvelle inertie inter-classes totale. Pour chaque classe,

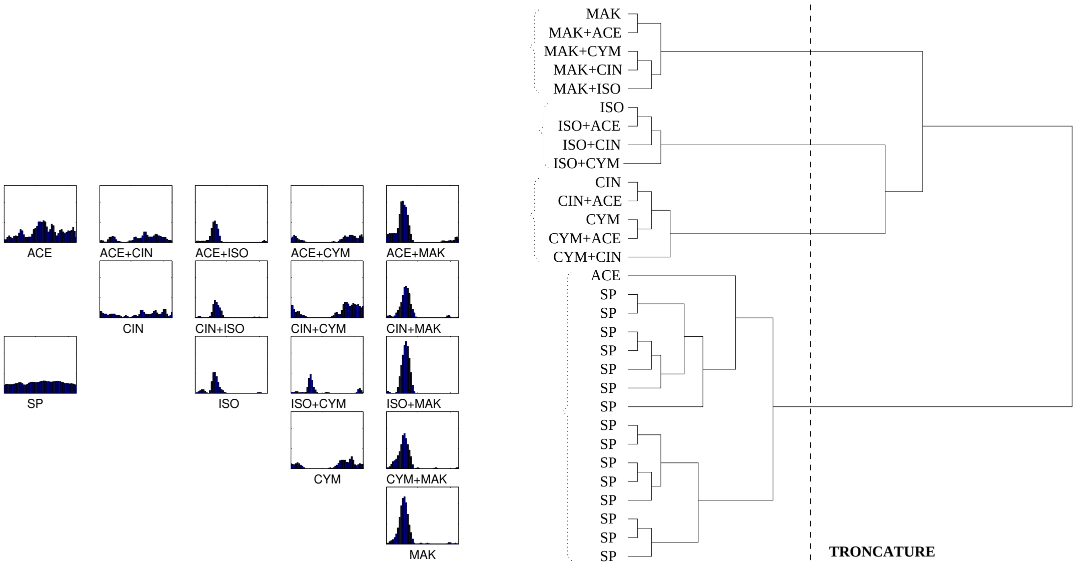


FIG. *5.1 : Exemple de classification hiérarchique ascendante de tous les motifs temporels présentés à gauche (et dans la figure 4.4). La troncature de l'arbre est réalisée juste au-dessus du nœud le plus bas permettant de regrouper dans une même classe tous les SP. Ici, ACE se trouve dans la même classe que les SP : on dira donc que cet odorant n'évoque pas de réponse. Les autres odorants évoquent des réponses, qui seront considérées comme identiques si elles se trouvent dans la même classe.*

l'inertie inter-classe est la somme des carrés des distances de chaque objet à la moyenne de la classe. L'inertie inter-classes totale est la somme des inerties inter-classes sur toutes les classes.

L'étude de l'ensemble des dendrogrammes (non figuré) montre que la variabilité de l'activité spontanée est différente d'une cellule à l'autre : l'inertie inter-classe de la classe qui regroupe tous les SP est très variable. De manière à tenir compte de cette variabilité, les classes de motifs sont établies par troncature de l'arbre au niveau du nœud le plus bas permettant de regrouper dans une même classe tous les SP (*cf.* figure 5.1). Les EV se trouvant dans la même classe que les SP seront considérés comme des non-réponses. Les autres EV seront considérés comme évoquant des réponses, réponses identiques s'ils sont dans la même classe, et différentes s'ils sont dans deux classes distinctes.

5.2.3 Évaluation de la classification hiérarchique ascendante

Les tableaux 5.2 montrent les résultats de la classification hiérarchique ascendante en comparaison avec les résultats de la classification visuelle. Le principe de cette évaluation est présenté Annexe B.2.

Aussi bien pour la comparaison SP/EV que pour la comparaison EV/EV, cette méthode est très spécifique mais manque de sensibilité par rapport aux comparaisons visuelles. La variabilité importante de l'activité spontanée demande en effet une troncature très haute, et regroupe beaucoup de motifs évoqués avec le motif spontané. Cela est

Comparaison SP/EV		Observateur 1 motifs identiques	Observateur 1 motifs différents	Observateur 2 motifs identiques	Observateur 2 motifs différents
CHA	motifs identiques	137	200	246	91
	motifs différents	15	247	60	202
	évaluation	Sp = 90%	Se = 55%	Sp = 80%	Se = 69%

Comparaison EV/EV		Observateur 1 motifs identiques	Observateur 1 motifs différents	Observateur 2 motifs identiques	Observateur 2 motifs différents
CHA	motifs identiques	321	217	595	172
	motifs différents	93	275	126	304
	évaluation	Sp = 78%	Se = 56%	Sp = 83%	Se = 64%

TAB. *5.2 : Évaluation des résultats de la classification hiérarchique ascendante (CHA) par rapport à la classification visuelle par deux observateurs différents (Observateur 1 et Observateur 2) pour la comparaison des motifs évoqués avec les motifs spontanés (SP/EV) et pour la comparaison des paires de motifs évoqués (EV/EV). L'évaluation de la CHA est réalisée au moyen de sa spécificité (Sp) et de sa sensibilité (Se).*

particulièrement net quand une cellule modifie son activité spontanée au cours de l'enregistrement. Toutes les activités évoquées sont alors classées dans les non-réponses.

La classification hiérarchique ascendante a l'avantage de comparer les motifs cellule par cellule, et donc de s'adapter aux variations d'intensité et de variabilité entre les cellules, mais manque pour la même raison de sensibilité lorsque les cellules ont une activité spontanée variable.

L'autre inconvénient de cette méthode est la dépendance du niveau de troncature avec le nombre de stimulations réalisées par cellule. En effet, l'inertie inter-classe de la classe des SP augmente avec le nombre de SP. On peut donc limiter le nombre de SP intégrés au dendrogramme à un seuil maximum (par exemple 15), mais la méthode devient inapplicable lorsqu'un trop petit nombre de SP est disponible, ce qui impliquerait une troncature plus basse que pour les autres cellules, et donc une spécificité moins forte.

5.3 Comparaison probabiliste des motifs

Pour pallier aux problèmes présentés par la classification hiérarchique ascendante, nous avons élaboré une méthode automatique originale, spécifiquement adaptée à notre problématique. Cette méthode probabiliste compare deux motifs temporels en considérant qu'ils ont tous deux été générés par un processus de Poisson non stationnaire. Sous cette hypothèse, la comparaison de motif revient à décider s'ils ont été générés par le même processus ou non.

À condition de négliger l'organisation temporelle fine de la décharge d'un neurone (intervalle inter-spikes...), ce qui est le cas avec le mode de description choisi, le nombre de potentiels d'action émis dans une condition donnée pendant un intervalle de temps donné peut être modélisé par un processus de Poisson $\mathcal{P}(\lambda)$ d'intensité λ [3, 9, 47, 30]. Ce processus est détaillé dans l'Annexe C. Comme nous l'avons déjà souligné, les conditions de stimulation, et la réponse des cellules mitrales, ne sont pas constantes au cours du cycle respiratoire pour un même stimulus. Un motif temporel sera donc considéré comme une réalisation d'un processus de Poisson non stationnaire, c'est-à-dire d'intensité variable au cours du cycle respiratoire.

Le principe de cette méthode est de faire une hypothèse H_0 : "les deux motifs ont été générés par le même processus de Poisson non stationnaire", puis de décider si on peut rejeter H_0 avec un risque de première espèce (probabilité de rejeter H_0 sachant que H_0 est vraie) inférieur à 5%. Cette décision permettra de déterminer la réactivité de la cellule à un odorant (si son EV est significativement différent du SP) et sa capacité à discriminer deux odorants (si les deux EV sont significativement différents). La méthode est appliquée en deux étapes : il s'agit dans un premier temps de déterminer indépendamment pour chaque bin le niveau de significativité de la différence du nombre de PA contenus dans ce bin, puis dans un deuxième temps de décider si l'ensemble de ces différences est suffisant pour conclure que les motifs sont différents.

5.3.1 Comparaison des deux motifs bin à bin

Le nombre de PA dans un bin i est une variable aléatoire de Poisson d'intensité λ_i. La première étape revient à décider pour chaque bin la probabilité pour que les réalisations à comparer proviennent de la même loi.

Comparaison SP/EV

Pour le motif spontané SP, les enregistrements sont assez nombreux pour assimiler λ_i à $SP(i)$. On peut donc calculer l'intervalle de confiance $I_{i,p}$ autour de $SP(i)$ représentant l'ensemble des fréquences de décharge ayant une probabilité supérieure à p de provenir du même processus $\mathcal{P}(SP(i))$. Ce calcul est développé dans l'Annexe C.2.2. On considère alors que $EV(i)$ est différent de $SP(i)$ au niveau de significativité p s'il n'appartient pas à l'intervalle $I_{i,p}$.

Comparaison EV/EV

Pour comparer les EV sous deux conditions EV_X et EV_Y, comme on ne connaît pas $(\lambda_i)_i$, on calcule l'intervalle $I_{i,p}$ autour de 1 représentant l'ensemble des fractions $\frac{EV_X(i)+1}{EV_Y(i)+1}$ telles que les couples $(EV_X(i), EV_Y(i))$ aient une probabilité supérieure à p de provenir du même processus de Poisson. Ce calcul est développé dans l'Annexe C.2.3. Cet intervalle dépend bien sûr des fréquences $EV_X(i)$ et $EV_Y(i)$. On considère alors que $EV_X(i)$ et $EV_Y(i)$ sont différents au niveau de significativité p si le rapport $\frac{EV_X(i)+1}{EV_Y(i)+1}$ n'appartient pas à l'intervalle $I_{i,p}$.

5.3.2 Décision sur la significativité de la différence des motifs

En considérant que les N bins sont indépendants, on calcule ensuite le nombre minimal de bins différents nécessaires pour exclure l'hypothèse selon laquelle les deux histogrammes sont identiques (au niveau de significativité 5%). Cette valeur est donnée par la loi binomiale $\mathcal{B}(N,p)$. Par exemple, pour N=45, et p=10%, il suffit de $N_{10\%} = 9$ bins différents, et pour p=1%, il suffit de $N_{1\%} = 3$ bins. Pour 15 bins, on trouve $N_{10\%} = 5$ et $N_{1\%} = 2$. Afin de prendre en compte aussi bien les motifs peu différents sur un grand nombre de bins, ou très différents sur un petit nombre de bins, nous avons retenu comme significativement différents les couples de motifs où, soit au moins $N_{10\%}$ bins sortaient de $I_{10\%}$, soit au moins $N_{1\%}$ bins de $I_{1\%}$.

5.3.3 Évaluation de la comparaison probabiliste

La comparaison probabiliste est elle aussi évaluée selon le principe présenté Annexe B.2. Le tableau 5.3 montre que la classification réalisée par cette méthode est acceptable puisque les taux de divergence avec les observateurs sont du même ordre que ceux entre eux deux (donnés dans le tableau 5.1). Le seuil de la comparaison EV/SP semble le même que celui de l'observateur 1, et un peu plus sensible que celui de l'observateur 2. Quant à la comparaison EV/EV, les résultats sont un peu moins bons, mais le niveau de significativité est parfaitement adapté au seuil de décision des observateurs.

Comparaison SP/EV		Observateur 1		Observateur 2	
		motifs identiques	motifs différents	motifs identiques	motifs différents
CP	motifs identiques	203	178	300	81
	motifs différents	77	548	198	427
	évaluation	Sp = 73%	Se = 75%	Sp = 60%	Se = 84%

Comparaison EV/EV		Observateur 1		Observateur 2	
		motifs identiques	motifs différents	motifs identiques	motifs différents
CP	motifs identiques	448	224	746	229
	motifs différents	210	468	322	506
	évaluation	Sp = 68%	Se = 68%	Sp = 70%	Se = 69%

TAB. *5.3 : Évaluation des résultats de la comparaison probabiliste (CP) par rapport à la classification visuelle par deux observateurs différents (Observateur 1 et Observateur 2) pour la comparaison motif évoqué / motif spontané (SP/EV) et pour la comparaison des paires de motifs évoqués (EV/EV).*

Cette méthode présente le net avantage de tenir compte du processus qui a généré les motifs, et de fournir un seuil de significativité *a priori*, valable pour toutes les cellules. Elle calcule la distance à partir de laquelle leurs motifs sont assez éloignés pour exclure l'hypothèse selon laquelle ils proviennent de la même loi avec moins de 5% de probabilité d'erreur. Elle laisse la liberté de choisir l'intervalle de confiance pour chaque bin, en adaptant le nombre de bins nécessaires à la significativité de la différence. Le choix des intervalles $I_{10\%}$ et $I_{1\%}$ a été fait *a priori*, mais correspond bien aux critères de décision des deux observateurs.

Cette méthode sera adoptée par la suite pour décider si deux motifs temporels sont significativement différents ou non.

5.4 Décomposition linéaire du mélange sur ses composants

La méthode de comparaison présentée dans le chapitre précédent génère une décision sur l'identité de deux motifs temporels qui tient compte du processus de génération de ces motifs. Elle ne donne toutefois qu'une information binaire sur le degré de ressemblance des motifs. Nous avons donc été amenés à élaborer une méthode qui donne un indicateur continu de la contribution, dans le motif évoqué par le mélange, des motifs évoqués individuellement par ses deux composants. Cette méthode extrait, par décomposition linéaire, les composantes proportionnelles aux motifs évoqués par chacun des deux odorants dans le motif évoqué par le mélange.

Représentons chaque motif temporel par un vecteur en 45 dimensions (les 45 bins), et notons $\vec{V}_{XY}$ le vecteur correspondant au motif évoqué par le mélange XY, $\vec{V}_X$ et $\vec{V}_Y$ les vecteurs représentant les motifs évoqués par les deux composants X et Y. Si les vecteurs $\vec{V}_X$ et $\vec{V}_Y$ ne sont pas colinéaires, on peut projeter orthogonalement $\vec{V}_{XY}$ sur le plan défini par $\vec{V}_X$ et $\vec{V}_Y$, et exprimer ce projeté en fonction de $\vec{V}_X$ et $\vec{V}_Y$. On obtient donc :

$$\vec{V}_{XY} = \alpha_X \vec{V}_X + \alpha_Y \vec{V}_Y + \vec{R} \tag{5.1}$$

où $\vec{R}$ est le résidu de projection, orthogonal à $\vec{V}_X$ et à $\vec{V}_Y$, et où α_X et α_Y représente les influences relatives des composants X et Y sur le mélange XY.

Pratiquement les 47 inconnues sont calculées en résolvant le système de 47 équations :

$$\begin{cases} \vec{V}_{XY} = \alpha_X \vec{V}_X + \alpha_Y \vec{V}_Y + \vec{R} \\ \vec{V}_X . \vec{R} = 0 \\ \vec{V}_Y . \vec{R} = 0 \end{cases} \tag{5.2}$$

à condition que $\vec{V}_X$ et $\vec{V}_Y$ ne soient pas colinéaires, c'est-à-dire que les motifs évoqués par les deux composants ne soient pas identiques à un facteur multiplicatif près.

Les coefficients α_X et α_Y permettent alors de quantifier la participation de chacun des deux composants X et Y dans le motif évoqué par leur mélange.

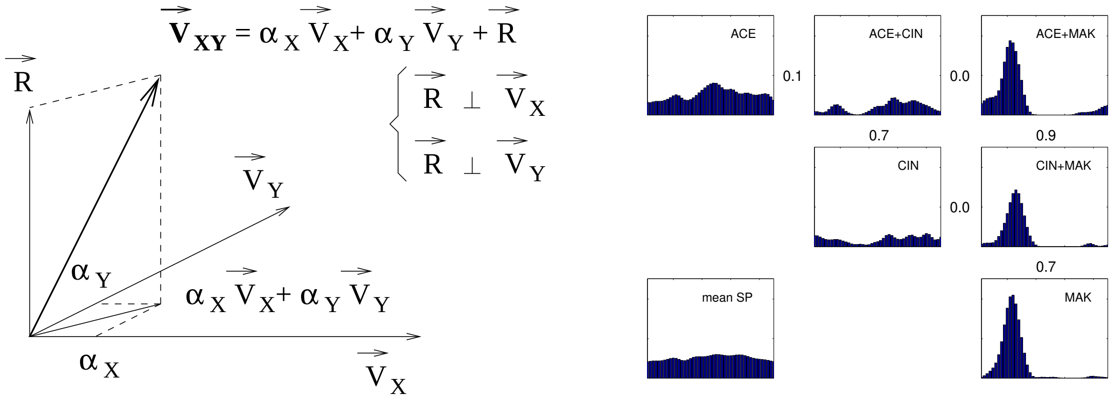


FIG. *5.2 : Projection du vecteur mélange sur chacun de ses deux composants. À gauche : Principe de la projection. À droite : Un exemple de coefficients de projection de 3 mélanges sur leurs deux composants. Les motifs évoqués par les odeurs pures se trouvent sur la diagonale, les motifs évoqués par les mélanges se trouvent à l'intersection des lignes et des colonnes occupées par leurs composants. Les coefficients de projection sont indiqués au dessous et à gauche de chaque mélange, dans la direction des composants auxquels ils correspondent. Par exemple pour le mélange ACE+CIN,* $\alpha_{ACE} = 0.1$ *et* $\alpha_{CIN} = 0.7$.