COMPTES RENDUS DU V^e CONGRÈS

DE

L'UNION INTERNATIONALE POUR L'ÉTUDE DES INSECTES SOCIAUX

Toulouse 5 - 10 Juillet 1965

Ouvrage publié avec le concours du Centre National de la Recherche Scientifique

LABORATOIRE D'ENTOMOLOGIE DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE ÉLECTROPHYSIOLOGIQUE DE L'OLFACTION CHEZ DEUX ESPÈCES D'INSECTES : *BLABERA CRANIIFER* et *GEOTRUPES SYLVATICUS*

par Jean-Claude GUILLET et Jacques BOISTEL
(Laboratoire de Physiologie Animale, Faculté des Sciences de Rennes, France)

Le message nerveux, émis par les récepteurs olfactifs, renseigne les centres non seulement sur l'intensité et la durée de la stimulation, mais aussi sur la qualité d'une odeur déterminée. Il est donc intéressant d'étudier selon quel processus ce message est élaboré au niveau des récepteurs et d'examiner les facteurs susceptibles de le modifier. Les insectes, dont on connaît la très grande sensibilité vis-à-vis des odeurs, se prêtent bien à une étude électrophysiologique. Il est en effet possible d'enregistrer d'une part l'activité plus ou moins globale des récepteurs (SCHNEIDER, 1961), d'autre part, dans certains cas favorables, la réponse d'un seul d'entre eux (SCHNEIDER, 1961).

Deux problèmes particuliers retiendront notre attention : tout d'abord, en étudiant la réponse globale des récepteurs d'une antenne sectionnée d'une blatte (*Blabera craniifer*), nous essaierons de voir si la réponse peut être influencée par le brassage des molécules de parfum autour de la préparation. Nous verrons ensuite s'il est possible d'établir, dans le cas d'un seul récepteur de blatte et de géotrupe (*Geotrupes sylvaticus*) de nouvelles relations entre le potentiel générateur et la fréquence des influx induits.

TECHNIQUES

La technique d'enregistrement de l'activité globale d'une antenne (ou électro-antennogramme ou E.A.G.) que nous avons utilisée est celle qui a été décrite par SCHNEIDER (1961).

Plusieurs méthodes permettent de mettre en évidence l'activité électrique d'un seul récepteur. Nous avons choisi celle que SCHNEIDER (1963) a mise au point. Cette technique, qui consiste à placer une micropipette à la base d'une sensille, est difficilement applicable dans le cas d'une antenne de blatte dont les récepteurs sont peu denses. Aussi, notre étude à l'échelon unitaire a-t-elle essentiellement porté sur les antennes de *Geotrupes sylvaticus*. En effet, les lamelles qui constituent les extrémités de celles-ci sont très riches en récepteurs olfactifs, ce qui facilite beaucoup la mise en place des électrodes.

Il suffit de faire glisser contre la cuticule la pointe de la micropipette de verre constituant l'électrode pour que celle-ci rencontre assez souvent la base d'une sensille.

Dans les deux cas, l'emploi d'un cathode follower s'est avéré nécessaire en raison de l'impédance élevée de la préparation et des électrodes.

L'E.A.G., de même que le potentiel générateur, ont été obtenus grâce à l'emploi d'un amplificateur à courant continu. Un amplificateur à courant alternatif, muni d'un filtre permettant d'éliminer les phénomènes lents, a été utilisé pour l'enregistrement des potentiels d'action à partir d'un seul récepteur. Ceux-ci sont rendus diphasiques par le filtre.

Comme stimulus odorant, nous avons surtout utilisé l'acétate d'amyle qui donne des réponses assez amples; il a déjà été testé sur la blatte par BOECKH, PRIESNER, SCHNEIDER, JACOBSON (1963). Dans la plupart des expériences, le parfum était soufflé contre l'antenne selon la technique de SCHNEIDER (1961) : de l'air, préalablement humidifié était dirigé soit vers un tube muni d'un papier filtré sec, soit vers un tube contenant un papier filtre imbibé de la substance odorante. Ce système permet notamment d'envoyer de l'air pur sur la préparation durant l'intervalle de temps séparant deux stimulations successives et surtout d'étudier la réaction de l'antenne au choc de l'air survenant au début de chaque stimulation. Il est en effet important de déterminer si les récepteurs tactiles situés sur l'antenne sont stimulés dans ces conditions.

Pour éviter que les récepteurs ne s'adaptent au parfum utilisé, l'atmosphère qui entoure la préparation peut être renouvelée au moyen d'un ventilateur à fort débit qui chasse l'air vers l'extérieur à travers un tuyau de gros diamètre. L'orifice inférieur de celui-ci est situé à une vingtaine de centimètres au-dessus de la préparation.

RÉSULTATS

I — Influence du déplacement de l'air sur l'électro-antennogramme de la blatte.

Dans une première série d'expériences, le parfum était simplement déposé sur une lame de verre, sous l'antenne : dans ces conditions, il n'était pas possible, en général, de déceler une réponse. Dans une deuxième série d'expériences, le parfum était soufflé pendant une à deux secondes toutes les minutes. Les stimulations étaient effectuées successivement sans et avec ventilation.

Dans le cas d'une stimulation sans aspiration d'air, la déflexion est rapide et la réponse atteint en 0,3 secondes son amplitude maximale (300 μ V dans l'exemple donné par la figure 1, A). Puis, tandis que

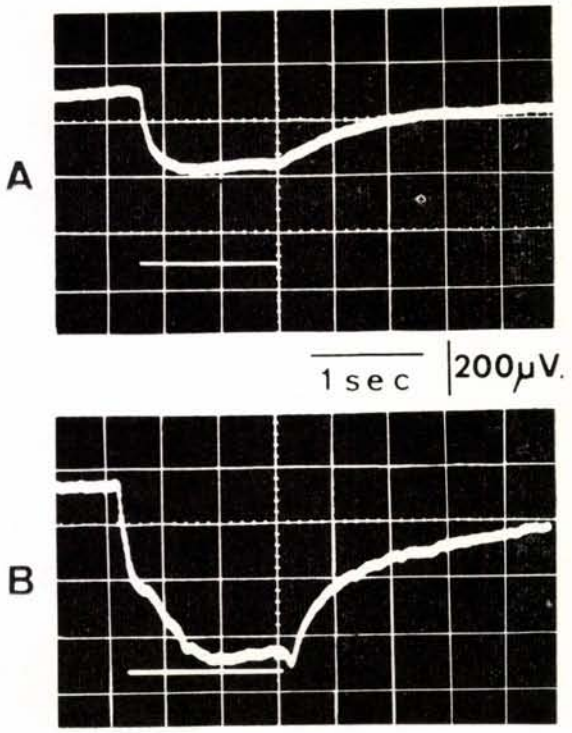

FIG. 1. — Electro-antennogrammes d'une antenne isolée de *Blabera* : On constate que la réponse à une stimulation odorante, dont la durée est indiquée par le trait continu situé au-dessus de chaque tracé, est beaucoup plus ample avec ventilation (tracé B) que sans ventillation (tracé A).

dure la stimulation, la déflexion décroît d'amplitude. A l'arrêt de la stimulation, la diminution de la réponse est d'abord assez rapide durant une seconde puis beaucoup plus lente. L'allure générale du tracé correspond à celle décrite par BOECKH (1963), dans le cas de la blatte également, mais l'amplitude est beaucoup plus faible.

Enfin, si l'on associe la stimulation à une aspiration d'air, on obtient, comme dans le cas précédent, une déflexion qui atteint très rapidement une valeur élevée (350 μ V dans le cas de la fig. 1, B). Mais ensuite, cette déflexion continue à croître pendant 0,3 seconde et atteint une valeur de 600 μ V. Un palier lui fait suite qui dure pendant tout le temps de la stimulation. Dès l'arrêt de celle-ci, la réponse décroît d'amplitude, rapidement d'abord, puis plus lentement et ne s'achève qu'au bout d'une dizaine de secondes.

Les deux E.A.G. que nous présentons font partie d'une série d'enregistrements au cours desquels les stimulations ont été réalisées sur la même préparation, successivement avec et sans ventilation. Les

phénomènes décrits ci-dessus se répétant régulièrement, on ne peut pas attribuer les différences d'amplitude constatées à une différence d'intensité de stimulation. Les réponses obtenues au cours des expériences effectuées dans les mêmes conditions n'ont pas été toujours aussi régulières. De plus, la forme et l'amplitude de l'E.A.G. varient notablement d'une préparation à l'autre. Mais lorsqu'une antenne présente, dans des conditions identiques, des E.A.G. réguliers et stables au cours de stimulations successives, ce qui était le cas dans l'expérience décrite ci-dessus, il est alors possible de mettre en évidence l'influence de la ventilation.

DISCUSSION. — Lorsque le parfum est déposé sous l'antenne sans renouvellement d'air, l'absence de réponse nette peut s'expliquer de plusieurs façons : tout d'abord, il est probable que les molécules odorantes ne stimulent pas tous les récepteurs en même temps, comme dans le cas où le parfum est soufflé. Or, la réponse simultanée d'un grand nombre de récepteurs semble être nécessaire pour observer la phase rapide de dépolarisation. En outre, des expériences réalisées dans ces conditions sur des antennes d'abeille et de guêpe par BOISTEL (1953, 1955), mettent en évidence une adaptation des récepteurs olfactifs.

Dans le cas de l'expérience illustrée par la figure 1, A, on pourrait penser que, l'air étant saturé en parfum, tous les récepteurs olfactifs sont stimulés. Or, lorsque la ventilation est assurée (*fig.* 1, B), le spot continue à descendre, l'E.A.G. atteignant alors une amplitude maximale. L'explication de ce phénomène est délicate pour l'instant, mais il est évident qu'il faut la rechercher au niveau des récepteurs. Certains d'entre eux doivent s'adapter rapidement alors que d'autres restent susceptibles de répondre pendant toute la durée de la stimulation.

Le brassage de l'air autour de l'antenne favorise certainement le renouvellement des molécules de parfum venant au contact des récepteurs, ce qui leur permettrait de se désadapter et de répondre plusieurs fois au cours d'une même stimulation. Ceci expliquerait pourquoi l'amplitude de l'E.A.G. est plus grande dans ce cas. Il est à remarquer, d'ailleurs, que l'E.A.G. obtenu avec ventilation présente le plus souvent des indentations très nettes alors qu'il est beaucoup plus régulier sans ventilation. Ce fait pourrait avoir la même origine. Il est de plus vraisemblable que la vitesse de déplacement des molécules odorantes contenues dans l'air influe sur l'amplitude de l'E.A.G.; ceci expliquerait pourquoi aucune réponse n'a pu être obtenue au cours de la première série d'expériences. De toutes façons, l'E.A.G. est un phénomène global et complexe. Nous pensons que, dans le cas de *Blabera*, l'étude de l'influence de la ventilation doit être poursuivie sur un seul récepteur; ceci permettra de savoir d'une part s'il existe des récepteurs à adaptation rapide et d'autres à adaptation lente,

d'autre part si la vitesse du déplacement des molécules influe sur la réponse de certains d'entre eux. Nos premiers résultats, encore peu nombreux, semblent confirmer cette dernière supposition. Ces observations devraient s'effectuer à la lumière des informations fournies par les expériences effectuées sur le comportement. On sait depuis longtemps que la blatte, mise en présence d'un parfum, brasse toujours un volume d'air assez important avec ses antennes avant de se diriger vers la source d'odeur. Ce fait n'est d'ailleurs pas particulier aux insectes : LEGENDRE (1958), qui a localisé l'organe olfactif des araignées au niveau de l'articulation rostropalpaire, note que ces animaux brassent énergiquement l'air avec leurs chélicères avant de s'orienter vers une source odorante. En outre, dans le cas des vertébrés supérieurs, un courant d'air est toujours assuré au niveau de l'épithélium olfactif et le seuil de la perception olfactive varie en fonction de la vitesse de déplacement des molécules odorantes.

II. — Étude du récepteur à l'échelon unitaire.

Il est probable que l'E.A.G. soit la somme des potentiels générateurs qui déclenchent, au niveau de chaque cellule, le départ des influx qui se propagent le long du nerf olfactif (SCHNEIDER, 1957 et 1963). Il est donc intéressant d'étudier attentivement ce potentiel générateur et son rôle dans le déclenchement des potentiels d'action.

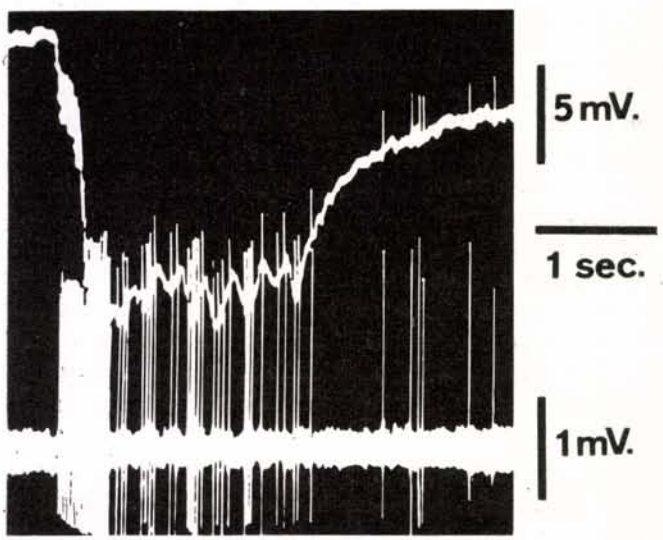

FIG. 2. — Réponse électrique d'un récepteur olfactif d'une antenne de *Blabera*. Le tracé supérieur, obtenu à l'aide d'un amplificateur à courant continu, représente le potentiel générateur. Celui-ci est surmonté de potentiels d'action qui seuls subsistent sur le tracé inférieur. Un amplificateur à courant alternatif, de gain plus élevé, a été utilisé dans ce dernier cas.

Ceci nous permettra d'entreprendre ultérieurement une étude approfondie, à l'échelon unitaire, de l'influence de la ventilation sur l'activité électrique des récepteurs.

Nos premiers résultats ont été obtenus dans le cas de la blatte : on constate que le décours du potentiel générateur (*fig.* 2, tracé supérieur) est très voisin de celui d'un E.A.G., bien que son amplitude soit nettement plus importante (elle peut atteindre une quinzaine de millivolts). Ce potentiel générateur est surmonté de potentiels d'action monophasiques qui sont seuls représentés, à plus forte amplification, sur le tracé inférieur de la même figure. Ceux-ci apparaissent alors diphasiques, un filtre étant inclus dans le système d'amplification.

Le point important est d'essayer de déterminer s'il existe une relation entre le décours du potentiel générateur et la fréquence correspondante des influx. Dans le cas de la figure 2, on constate qu'une activité électrique importante apparaît pour une dépolarisation faible du récepteur, puis se stabilise durant la phase de dépolarisation maximum du potentiel générateur. Elle diminue à nouveau tandis que le potentiel générateur décroît.

En raison de la difficulté qu'il y a d'obtenir, dans le cas de la blatte, des réponses unitaires, nous avons poursuivi cette étude sur le géotrupe. En vue d'une analyse plus fine des phénomènes, des enregistrements ont été effectués en utilisant une vitesse de balayage plus grande. Le potentiel générateur présente un décours analogue à celui que nous avons décrit dans le cas de la blatte; son amplitude peut atteindre 12 mV (*fig.* 3, C). Les modalités d'apparition des potentiels d'action peuvent varier d'un récepteur à l'autre : dans un premier cas, on voit que les potentiels d'action apparaissent lorsque la dépolarisation est presque maximale et avec un certain retard par rapport au potentiel générateur (*fig.* 3, A). Le rythme est maximum au début; il diminue ensuite avant de disparaître pendant la lente remontée du spot. Dans un deuxième cas (*fig.* 3, B), la fréquence des influx est maximale au début de l'établissement de la dépolarisation, elle est régulière lorsque celle-ci est stable et diminue tandis que le spot remonte. Il semble donc que la fréquence des influx soit alors en relation avec la pente de la dépolarisation et non avec l'amplitude de celle-ci. L'allure de la réponse est analogue à celle que nous avons décrite plus haut dans le cas de la blatte.

Ce type de réponse est plus net sur la figure 3, C, où l'amplitude du potentiel générateur n'est pas constante (ceci est vraisemblablement dû à la turbulence des molécules de parfum autour du récepteur). Alors que, dans la première phase, on enregistre une activité électrique pour une dépolarisation de 2 mV, au contraire, pendant la remontée du spot, on n'observe plus d'influx bien que la dépolarisation ait encore une amplitude d'une dizaine de millivolts.

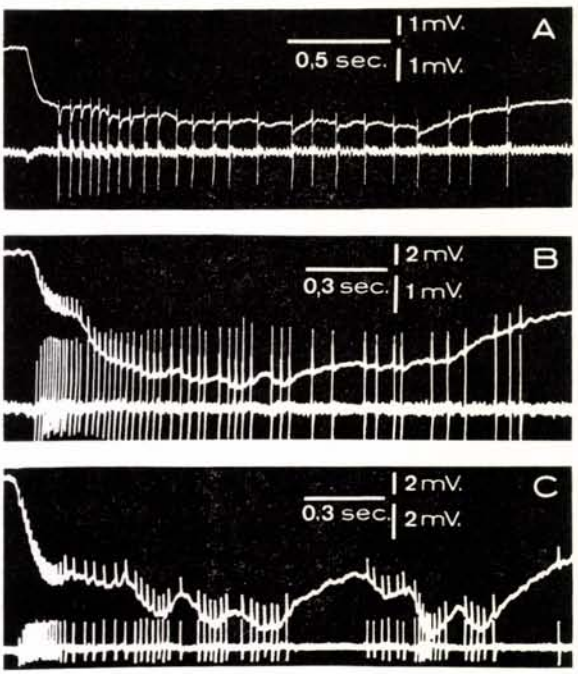

FIG. 3. — Réponses électroniques de récepteurs olfactifs d'antennes de géotrupe. Les tracés supérieur et inférieur de chaque enregistrement A, B et C représentent respectivement le potentiel générateur et les potentiels d'action correspondants.
En A : Les potentiels d'action n'apparaissent que lorsque la dépolarisation a à peu près atteint son niveau maximum.
En B et C : La fréquence des influx croît lors de chaque dépolarisation.
Les étalonnages d'amplitude sont donnés d'une part à la partie supérieure pour le potentiel générateur, d'autre part à la partie inférieure pour l'enregistrement des influx.

DISCUSSION. — Les résultats présentés par BOECKH (1962), SCHNEIDER et BOECKH (1962), LACHER (1964), notamment, semblent montrer que la fréquence des influx est maximale au début de la stimulation, donc, pendant l'établissement de la dépolarisation, puis diminue de façon importante avant de se stabiliser. La plupart de nos résultats sont en accord avec ces observations (*fig.* 3, B); d'autres suggèrent néanmoins que les potentiels d'action n'apparaissent que pour un niveau de dépolarisation qui se situe très près du maximum atteint. L'allure de la réponse se rapproche alors de celle d'un récepteur tonique (*fig.* 3, A). Dans le cas présenté figure 3, C, le potentiel générateur n'atteint pas immédiatement son amplitude maximale et ceci permet de constater que la fréquence des potentiels est davantage déterminée par l'établissement de la dépolarisation que par son amplitude. On n'observe plus d'influx lorsqu'une repolarisation, même partielle, s'amorce. Il pourrait s'agir dans ce cas de récepteurs phasiques émet-

tant des influx principalement lors d'une augmentation brusque de l'intensité du stimulus odorant.

Ces réponses, résultant de stimulations effectuées à l'aide de l'acétate d'amyle, semblent indiquer que l'allure de la réponse varie d'un récepteur à l'autre. Ces variations paraissent d'ailleurs résulter du fait que l'excitation d'un récepteur semble conditionnée par la mise en jeu successive de deux phénomènes antagonistes dont les amplitudes respectives pourraient varier et qui à chaque instant détermineraient la fréquence des influx : l'un d'eux favorise leur apparition, c'est le potentiel générateur; l'autre serait inhibiteur. C'est là tout au moins l'hypothèse formulée par HENSEL (1952) dans le cas des thermorécepteurs et reprise par BOECKH (1962).

On sait par ailleurs qu'un récepteur, stimulé par un parfum déterminé, peut être inhibé par un autre. Le potentiel générateur doit alors être remplacé par un potentiel hyperpolarisant, donc inhibiteur (BOECKH, 1962; SCHNEIDER, 1963).

Ces premiers travaux ne permettent pas d'établir pour l'instant toutes les relations qui existent entre le potentiel générateur et la fréquence des influx induits. Cette question nous semble digne d'intérêt puisqu'une telle relation a été mise en évidence dans le cas d'autres types de récepteurs.

CONCLUSION D'ENSEMBLE

Ces résultats soulèvent à nouveau le problème relatif à la naissance des influx au niveau du récepteur. Nos travaux ne permettent pas de l'éclaircir, mais ils apportent des éléments nouveaux qu'il sera intéressant d'étudier de façon plus approfondie à la lumière des interprétations proposées notamment par MORITA (1959).

L'étude de l'influence du brassage des molécules de parfum et du renouvellement de l'air autour des récepteurs sera effectuée à l'échelon unitaire au cours de prochaines recherches.

RÉSUMÉ

1. — Nous avons enregistré l'activité électrique des récepteurs olfactifs de deux espèces d'insectes : *Blabera craniifer* et *Geotrupes sylvaticus*.

2. — Dans le cas d'une antenne sectionnée de *Blabera*, l'amplitude des électro-antennogrammes est plus grande lorsqu'un renouvellement des molécules odorantes est réalisé autour de la préparation.

3. — Les récepteurs olfactifs des antennes de *Geotrupes*, stimulés par le même parfum, ne donnent pas tous naissance à la même forme de réponse électrique. Dans la plupart des cas, les potentiels d'action induits par le potentiel générateur apparaissent lors de l'établissement de la dépolarisation; cependant, pour certains récepteurs, les influx surviennent seulement lorsque le potentiel générateur a atteint son amplitude maximale.

4. — Il serait utile de préciser l'influence de la ventilation à l'échelon unitaire et d'établir les relations qui existent entre le potentiel générateur et la fréquence des influx induits.

BIBLIOGRAPHIE

BOECKH (J.), 1962 : Elektrophysiologische Untersuchungen einzelnen Geruchsrezeptoren auf der Antenne des Totengräbers (*Necrophorus*. Coleoptera). *Z. vgl. Physiol., 46,* 212-248.

BOECKH (J.), PRIESNER (E.), SCHNEIDER (D.), JACOBSON (M.), 1963 : Olfactory receptor response to the Coackroach Sexual attractant. *Science,* U.S.A., *141,* nº 3582, 716-7.

BOISTEL (J.), 1953 : Etude fonctionnelle des terminaisons sensorielles des antennes d'Hymenoptères. *C. R. Soc. Biol., 147,* 1683-1688.

BOISTEL (J.), LECOMTE (J.), CORABŒUF (E.), 1956 : Quelques aspects de l'étude électrophysiologique des récepteurs sensoriels des antennes d'Hymenoptères. *Insectes sociaux, 3,* 25-31.

HENSEL (H.), 1952 : Physiologie der Thermorezeptoren Ergebn. *Physiol., 47,* 166-368.

LACHER (V.), 1964 : Elektrophysiologische Untersuchungen an einzelnen Rezeptoren für Geruch, Kohlendiexyd, Luftenchtigkeit und Temperatur auf den Antennen der arbeits biene und Drohne (*Apis mellifica* L.). *Z. Vgl. Physiol., 48,* 587-623.

LEGENDRE (R.), 1958 : Recherches sur l'alfaction des araignées. *Ann. des Sci. Nat.,* IIᵉ Série, 20, 141-155.

MORITA (H.), 1959 : Initiation of Spike potentials in contact chemosensory hairs of insects III. D.C. Stimulation and generator potential of labellar chemoreceptor of *Calliphora. J. Cell. Comp. Physiol., 54,* 189-204.

SCHNEIDER (D.), 1955 : Mikro - Elektroden-registrieren die elektrischen impulse einzelner Sinnesnervenzellen der Schmetterlingsantenne. *Industrie. Elektronik* (Elektro, Spezial, Hambourg), *3,* 3-7 ?

SCHNEIDER (D.), 1957 : Elektrophysiologische Untersuchungen von Chemo-und Mechanorezeptoren der Antenne des Seidenspinners (*Bombyx mori.* L.). *Z. Vgl. Physiol., 40,* 8-41.

SCHNEIDER (D.), 1961 : Untersuchungen zum Bau und zur Funktion der Riechorgane von Schmetterlingen und Käfern. Berichte der Physikalisch. *Medizinischen zu Würzburg Nene Folge Bd.* 70.

SCHNEIDER (D.), 1963 : Electrophysiological investigation of insect olfaction. *Proc. Ist. Intern. Symposium of Olfaction and Taste.* Pergamon Press.

Interventions de M. DEMOLIN.

1° Avez-vous réalisé des expérimentations du même type avec d'autres composés et particulièrement ceux de la série aromatique ?

2° Enregistrez-vous des variations de potentiel très différentes en fonction de la concentration en Acétate d'amyle ? Ce qui permettrait d'expliquer certaines séquences de comportement ou l'on constate une attraction suivie d'une répulsion.

Réponses de M. GUILLET.

1° Nous avons surtout effectué les stimulations avec de l'acétate d'amyle qui a été utilisé par de nombreux auteurs. Nous avons testé aussi l'essence de citronnelle, l'essence de Bergamote, la coumarine et le Benzène (nous avons abandonné le benzène qui s'est montré toxique). Les réponses présentent entre elles quelques différences, mais nos expériences n'avaient pas pour but de faire une étude comparative des réponses.

2° L'amplitude de l'E.A.G. croît à peu près régulièrement jusqu'à un niveau maximum, en fonction de la concentration en parfum.

Interventions de M. VERRON.

1° Quelle est la technique de ventilation (on aimerait avoir un schéma) ?

2° Etude faite surtout avec des substances répulsives, a-t-on fait des expériences avec des substances attractives et notamment avec des broyats de blattes ?

Réponses de M. GUILLET.

1° L'air est aspiré à travers un tuyau de gros diamètre dont l'orifice est situé à une vingtaine de centimètres au-dessus de la préparation. Ceci crée une turbulence des molécules au niveau de la préparation.

2° Les E.A.G. que nous avons obtenus par stimulation avec l'odeur de jus de carotte ou celle d'un broyat de blatte avaient une amplitude assez faible, mais nous espérons pouvoir tester ces substances à l'échelon unitaire.

Intervention de M. HOWSE.

On a montré que les récepteurs chimiques peuvent fonctionner, dans certains cas, comme récepteurs pour l'humidité. Je voudrais demander si les courants d'air peuvent produire une évaporation sur la surface des sensilles et en conséquence avoir une influence sur le potentiel générateur.

Réponse de M. GUILLET.

L'action de l'humidité sur certains récepteurs olfactifs a été étudiée par LACHER en 1964.

Pour éviter un dessèchement de la surface des sensilles, l'air qui est soufflé en permanence sur la préparation est humidifié et nous n'avons pas réalisé d'expériences avec de l'air sec.