N° d'ordre NNT : 2016 LYSE1072

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED476

Neurosciences et Cognition

Soutenue publiquement le 17/06/2016, par :

Julie BOULANGER BERTOLUS

Réponses de peur et développement

Ontogenèse des vocalisations ultrasoniques et du décours temporel de la réponse dans un conditionnement de peur à l'odeur chez le rat

---

Devant le jury composé de :

Pr Sylvie GRANON	(Professeure des universités)	Rapporteure
Dr Frédéric LEVY	(Directeur de recherche)	Rapporteur
Dr Paul APICELLA	(Directeur de recherche)	Examinateur
Dr Valérie DOYERE	(Directrice de recherche)	Examinatrice
Pr Rémi GERVAIS	(Professeur des universités)	Examinateur
Pr Regina SULLIVAN	(Professeure des universités)	Examinatrice
Dr Anne-Marie MOULY	(Chargée de recherche)	Directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E.PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Cette thèse est un peu la conclusion de plusieurs années de ma vie et plusieurs personnes y ont contribué, sans qui elle n'aurait pas été possible. Quelques remerciements sont aujourd'hui de mise.

Je voudrais tout d'abord remercier Anne-Marie Mouly, ma directrice de thèse. Tu m'as acceptée en stage en M1, alors que je ne connaissais presque rien aux neurosciences et tu m'as très patiemment enseigné toutes les étapes de la recherche malgré mes questionnements constants, avec bienveillance malgré mon sale caractère, et avec une grande disponibilité malgré mon impatience parfois, et ma fâcheuse manie de faire les choses au dernier moment. Merci pour tous tes conseils, en recherche, mais aussi dans les différents choix que j'ai eu à faire. Tu m'as offert un cadre exceptionnel pour réaliser ma thèse, en me permettant de voyager, de découvrir d'autres laboratoires et de participer à de nombreux congrès internationaux. Pour tout ça, les mots me paraissent pauvres mais merci infiniment.

I also need to thank Regina Sullivan who was involved in the thesis project from the beginning. I am deeply thankful for everything you have done for me during these past 5 years. You welcomed me in your lab and gave me the incredible opportunity to discover New-York, the functioning of an American lab and the great people in your team. Thank you also for all the inspiring discussions we had, it has been a real honor to work with you and I really hope we keep in touch in the future. Thank you also for accepting to be part of my jury.

Je remercie également Valérie Doyère, avec qui j'ai pu non seulement collaborer étroitement sur toute la partie timing de cette thèse mais qui m'a aussi accueillie dans son équipe pendant mon stage de M2. Tu m'as énormément appris et j'ai souvenir de discussions passionnantes sur le timing pour lesquelles je voulais te remercier. Tu as aussi eu un rôle très important dans tous les voyages que j'ai eu l'occasion de faire via les réseaux de collaborations que tu as orchestrés, d'abord avec le PUF puis avec le LIA, et je te remercie encore sincèrement pour ces opportunités qui n'auraient probablement pas existé sans toi. Et merci enfin d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci à Rémi Gervais, à plusieurs niveaux, puisqu'il a porté plusieurs casquettes : merci au directeur d'équipe et co-directeur du CRNL pour la chance que j'ai eu de pouvoir travailler dans un contexte aussi propice à l'épanouissement scientifique et humain. Merci au directeur de l'école doctorale d'avoir été toujours présent et disponible pour les étudiants et pour moi en particulier quand j'avais des questions. Merci au chercheur : vous avez toujours eu des critiques très constructives et intéressantes sur mon travail, et j'ai vraiment apprécié nos discussions. Merci aussi d'avoir participé à mes comités de suivi de thèse. Merci enfin d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie sincèrement Frédéric Lévy et Sylvie Granon qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail, et Paul Apicella qui a bien voulu en être examinateur. J'ai énormément apprécié les échanges que nous avons eu pendant ma soutenance. Merci encore à tous les membres de mon jury pour ce moment très épanouissant scientifiquement.

Je remercie aussi Martine Meunier et Igor Branchi qui ont accepté de participer à mes comités de suivi de thèse et m'ont donné d'excellents conseils à ces occasions, autant en termes scientifiques qu'en ce qui concerne la thèse elle-même ou ce qui viendra après.

Il me faut aussi remercier l'ensemble des personnes qui créent au jour le jour le contexte dans lequel j'ai eu la chance de travailler pendant plus de 4 ans : merci à toute l'équipe CMO, aux chercheurs et chercheuses de Gerland et du CRNL de manière plus étendue, et à toutes celles et ceux que ce travail m'a permis de rencontrer. Merci à celles et ceux avec qui j'ai eu l'occasion de collaborer de manière

occasionnelle, avec qui j'ai pu discuter de science et d'autres choses au détour d'un couloir, autour d'un café, à table ou pendant les multiples temps d'attente des manips. Ce sont aussi toutes ces petites collaborations et discussions qui ont façonné cette thèse et rendu cette expérience épanouissante. Merci aux étudiant(e)s qui sont passé(e)s au labo, que j'ai encadré(e)s ou non, qui nous rappellent avec leurs questions et leur intérêt toujours renouvelé que nous faisons quand même un super chouette métier !

Merci aux équipes administratives et techniques qui nous facilitent la vie tous les jours. Je ne sais pas comment on ferait sans vous : merci Samuel Garcia pour les scripts Python, les conseils et astuces quand j'essayais de me débrouiller toute seule en programmation et les 5min volées de ton emploi du temps trop plein lorsque des conseils seuls ne suffisaient pas. Merci Marc Thévenet et Belkacem Messaoudi pour le setup expérimental et Volcan, et pour leur disponibilité quand je venais les voir en catastrophe parce que, évidement, c'est toujours quand on est au milieu d'une manip, ou qu'on n'a pas le temps, que ça bug. Merci à Vincent Farget et Hervé Hugueney pour les ordis, le coup de main technique pour mettre en place les médias étudiants et la gestion du stockage des données et du disque toujours plein. Merci à Florence Léger, Manuela Allegro et Romain Saroli, le super trio qui nous facilitent toutes les démarches administratives. Et un ENORME merci à Ounsa, qui a pris soin de mes animaux pendant ma thèse et géré les reproductions et les sevrages.

Merci aussi à celles et ceux qui m'ont soutenue tout au long de cette thèse, de manière occasionnelle ou régulière.

Merci aux « filles » du labo d'avoir assuré le soutien au quotidien, quel que soit le moment de la journée où je débarquais dans leur bureau pour un thé : vous m'avez fait garder le sourire, permis de relativiser quand ça n'allait pas, de partager mon enthousiasme quand je voyais la vie en rose, et de découvrir les joies simples de « la petite bière au soleil sur les quais » à la fin de la journée.

Merci à mes amis : les parisiens, les lyonnais, mes colocs présents et passés, les danseurs et les Etu-CRNL. Vous m'avez tous offert des moments précieux qui rendent la vie plus belle. Merci d'avoir supporté le fait que je parlais tout le temps de ma thèse et de m'avoir rappelé qu'il y a une vie en dehors de ça.

Merci à ma famille. J'ai une chance tout bonnement incroyable de vous avoir, vous êtes absolument formidables. Je sais que je ne serais pas là sans vous.

Enfin, je voudrais conclure par une pensée pour les rats, rattes et ratons qui ont participé aux expériences.

Abbréviations

2-DG	2-désoxyglucose
BLA, CeA, CoA, LA, MeA	Amygdale BasoLatérale, Amygdale Centrale, Amygdale Corticale, Amygdale Latérale, Amygdale Médiale
CORT	Corticostérone
CP, CPa, CPp	Cortex Piriforme, Cortex Piriforme antérieur, Cortex Piriforme postérieur
FI, PI	procédure de renforcement à intervalle fixe procédure de type FI incluant des essais non-renforcés
LC	Locus coeruleus
SC, SI	Stimulus conditionné, stimulus inconditionné
NA	Noradrénaline
NMDA	N-Methyl-D-aspartate
mPFC	Cortex PréFrontal médian
PN10	Age : 10 jours postnataux
SBF	modèle de *Striatum Beat Frequency*
USV, USV HF, USV LF	Vocalisations ultrasoniques, Vocalisations ultrasoniques haute fréquence, Vocalisations ultrasoniques basse fréquence

Sommaire

Abbréviations 5
Sommaire 9
Avant-propos et présentation de la thèse 15
Introduction générale 19
Chapitre 1 – Mémoire, émotion et mémoire émotionnelle 21
I. La mémoire 23
1. Qu'est-ce que la mémoire ? 23
2. Des systèmes de mémoire multiples 23
II. La mémoire émotionnelle 28
1. Les émotions 28
2. La peur 29
3. La mémoire émotionnelle et le conditionnement de peur 30
Chapitre 2 – La neurobiologie du conditionnement de peur à l'odeur 33
I. Percevoir et traiter le stimulus olfactif 35
1. La fixation de l'odorant sur la muqueuse 36
2. L'influx de l'information vers le bulbe olfactif: un premier traitement 37
3. La respiration : flairage et modulation de l'activité des neurones du bulbe olfactif 39
4. Le traitement de l'information par le cortex olfactif primaire 39
II. Les structures du conditionnement de peur 40
1. Quelques précisions sur l'étude de la neurobiologie de la mémoire 40
2. La neurobiologie du conditionnement de peur au son 43
III. Le conditionnement de peur à l'odeur 48
1. Le rôle de l'amygdale dans la mémorisation de l'association odeur-choc 48
2. L'implication des cortex sensoriels 49
3. L'implication d'autres structures 50
Chapitre 3 – Ontogenèse du conditionnement de peur à l'odeur 51
I. Le modèle raton 53
1. Le développement moteur et sensoriel du raton 53
2. Le développement neuronal du raton 55
3. L'intérêt du modèle raton 56
II. Le conditionnement associatif olfactif chez le raton 57
1. Petite introduction à l'attachement 57
2. Le conditionnement associatif olfactif chez le raton au cours de la période sensible pour l'attachement 58
3. La neurobiologie du conditionnement de préférence olfactive du raton 59
4. Après la période sensible, acquisition du conditionnement de peur à l'odeur 62
5. La transition d'un conditionnement appétitif à aversif et l'implication de l'amygdale 62
Chapitre 4 – Mesurer la peur 65
I. L'expression comportementale de la peur 67

1. Le freezing 67
2. L'évitement 68
3. L'inhibition et l'activation comportementale 69
4. La potentialisation du sursaut 70
5. Autres comportements notables 71
II. Les modifications physiologiques dues à la peur 72
1. Modulation des hormones de stress 72
2. Le rythme respiratoire 73
3. Le rythme cardiaque 74
4. Analgésie 74
III. Exprimer une réponse de peur : les structures impliquées 75
IV. Conclusion 76
Travail expérimental 77
Etude 1 : La réponse de peur conditionnée à l'odeur et l'estimation temporelle 79
Introduction à la perception de la durée du stimulus conditionné 81
I. Estimation temporelle 83
1. Qu'est-ce que l'estimation temporelle ? 83
2. La propriété scalaire 84
3. Comment étudier l'estimation temporelle ? 85
4. Les structures neuronales support de la mémoire temporelle 87
II. L'estimation de la durée de l'odeur dans un conditionnement odeur – choc chez le rat adulte 92
1. Méthodes 92
2. Résultats 94
Publication 1 97
Etude 2 : Ontogenèse de la réponse émotionnelle au choc et vocalisations ultrasoniques 113
Introduction aux vocalisations ultrasoniques 115
I. Les organes de production des vocalisations 117
1. Le larynx : structure clé de la production des vocalisations audibles et ultrasoniques 118
2. La respiration : souffle indispensable pour siffler 119
II. Les différents types de vocalisations ultrasoniques 121
1. Chez l'adulte 121
2. Chez le raton 123
3. Le passage d'une vocalisation infantile à une vocalisation adulte 126
III. Circuits et neuromodulateurs impliqués dans les vocalisations 127
1. Chez l'adulte 127
2. Chez le raton 128
IV. Les vocalisations comme signal de communication 129
1. Chez l'adulte : effet sur un congénère 129
2. Chez le raton : effet sur la mère 130
Publication 2 133

Discussion et perspectives 159
I. La respiration, le freezing et les USV comme indices de mesure de la mémoire temporelle 161
1. Les USV, un indice peu adapté pour mesurer la mémoire temporelle 161
2. Le freezing, un indice de la mémoire temporelle sous certaines conditions 161
3. La respiration : un bon indice de la mémoire temporelle 162
4. Influence de la durée de l'intervalle à apprendre sur le décours temporel de la réponse 162
5. La respiration, une mesure de la mémoire temporelle quelle que soit la modalité sensorielle? . 163
II. Neurobiologie de la mémoire temporelle dans la tâche de conditionnement de peur à l'odeur chez l'adulte 164
1. Quel rôle pour le striatum dans le conditionnement de peur à l'odeur ? 164
2. Si ce n'est le striatum, qui donc ? 168
III. Neurobiologie de la mémoire temporelle chez le raton 169
IV. L'expression de la réponse émotionnelle au cours de la vie du rat 170
1. Une modification forte de la réponse émotionnelle entre la prime enfance et l'âge adulte 170
2. L'âge juvénile, un âge transition 177
V. Conclusion générale 178
Bibliographie 181
Publications et conférences scientifiques 215
I. Publications en lien avec le travail de thèse 217
II. Publications en dehors du travail de thèse 217
III. Présentations orales 217
IV. Présentations affichées 218
Annexe 1 – Revue Ecologically relevant neurobehavioral assessment of the development of threat learning. 219
Annexe 2 – Validation de la mesure semi-automatique du freezing 235

Avant-propos et présentation de la thèse

Un animal dans son milieu naturel est confronté à un environnement riche, complexe et souvent hostile dont il doit apprendre les règles pour survivre. Qu'il s'agisse de reconnaître ses aliments, de mémoriser la fonction sociale d'un congénère ou de se souvenir des lieux à contourner pour éviter de rencontrer un prédateur, mémoire et émotions sont intrinsèquement liées pour permettre à l'individu de répondre de manière adaptée à son environnement et augmenter ainsi ses chances de survie. Toutefois, l'environnement auquel un individu est confronté change entre la naissance et l'âge adulte, tout comme ses compétences motrices et cognitives. Par conséquent, la définition d'une réponse adaptée change également avec l'âge de l'animal.

Dans des conditions hostiles en particulier, la peur est une émotion qui déclenche tout un répertoire de réponses de défense permettant à l'organisme de réagir de façon optimale à un stimulus aversif. La peur peut être générée par un ensemble de stimuli naturellement aversifs ou par des stimuli ayant acquis une valeur aversive par apprentissage associatif. Le conditionnement de peur est un modèle expérimental très utilisé chez l'animal pour induire des mémoires de peur et les réponses de défense qui y sont associées. Les études présentées ici utilisent un conditionnement de peur à l'odeur chez le rat qui consiste à associer une odeur à un stimulus aversif et permet d'induire très rapidement et durablement des mémoires de peur à l'odeur. Du fait du développement très précoce de l'olfaction, ce modèle permet d'étudier la mémoire émotionnelle dès les premiers jours de vie et jusqu'à l'âge adulte. La réponse de peur peut alors être étudiée à la fois envers l'odeur apprise et envers le stimulus naturellement aversif. Cette thèse a pour but d'étudier les caractéristiques et modifications de la réponse de peur à ces deux types de stimuli au cours de l'ontogenèse.

Ce manuscrit de thèse commence par une introduction générale de quatre chapitres. Le premier chapitre introduit la mémoire, les émotions avec un accent particulier mis sur la peur, et la mémoire émotionnelle. Le second chapitre décrit la neurobiologie du conditionnement de peur à l'odeur. Il commence par la description rapide des structures cérébrales et mécanismes permettant le traitement de l'information olfactive, puis s'intéresse aux circuits du conditionnement de peur en prenant l'exemple très étudié du conditionnement de peur au son. Les connaissances actuelles de la neurobiologie du conditionnement de peur à l'odeur sont ensuite résumées. Un troisième chapitre s'intéresse à l'ontogenèse de la mémoire associative odeur-choc. Ce chapitre commence par décrire le développement sensorimoteur et cérébral du raton et discute l'intérêt d'étudier les stades les plus précoces de la vie. J'y décris ensuite les caractéristiques du conditionnement associatif odeur-choc pendant la prime enfance du rat. Enfin, cette introduction générale contient un chapitre plus méthodologique décrivant les différentes mesures comportementales et physiologiques de la peur, leurs avantages respectifs et leur expression au cours de l'ontogenèse.

La partie expérimentale de cette thèse comprend deux études qui seront chacune introduites par un chapitre spécifique. La première étude s'intéresse à l'ontogenèse de la production d'une réponse de peur à l'odeur temporellement adaptée aux conditions expérimentales. En effet, un rat auquel une odeur et un choc sont présentés de manière associée et répétée apprend non seulement que l'odeur prédit si le choc va arriver mais également *quand* est-ce qu'il est dû. Cette capacité est liée à la mémoire temporelle de l'animal et se reflète dans le décours temporel de sa réponse de peur en présence du stimulus conditionné. Nous avons étudié l'ontogenèse de cette réponse temporelle et questionné le rôle du striatum dans ce processus cognitif aux différents âges de vie. Cette étude est précédée d'une introduction bibliographique présentant la mémoire temporelle, quelques points clés de sa neurobiologie et l'état de l'art concernant la mémoire temporelle au cours du conditionnement de peur à l'odeur avant que je débute cette thèse.

La deuxième étude s'intéresse à la modification au cours de l'ontogenèse de l'une des réponses de défense du rat, les vocalisations ultrasoniques, lorsqu'il est confronté à un évènement

aversif. Parmi les réponses de peur, la réponse vocale ultrasonique présente des caractéristiques très différentes entre la prime enfance et l'âge adulte, tant sur le plan des paramètres fréquentiels des vocalisations que par les conditions expérimentales qui les induisent. Or aucune étude à notre connaissance n'a examiné cette réponse de peur en utilisant un même paradigme tout au long de l'ontogenèse. La deuxième étude vise donc à examiner la modification de cette réponse vocale au cours de l'ontogenèse en utilisant des conditions expérimentales aversives identiques aux différents âges étudiés afin de les comparer et de mieux appréhender les états émotionnels qu'elle exprime. Cette étude est introduite par une partie bibliographique résumant les observations et connaissances actuelles sur les vocalisations ultrasoniques émises par le rat au cours de sa vie.

L'ensemble des résultats expérimentaux du travail de thèse sont ensuite repris et discutés et quelques perspectives sont présentées, éventuellement étayées par des données préliminaires.

Introduction générale

Chapitre 1

Mémoire, émotion et mémoire émotionnelle

I. La mémoire

1. Qu'est-ce que la mémoire ?

Entre votre naissance et le moment où vous lisez ces lignes, vous avez beaucoup changé. Physiquement, bien sûr, du nouveau-né à l'organisme adulte, vous avez pris quelques centimètres. Mais également dans votre interaction avec votre environnement. Vous avez développé des capacités de locomotion et coordination fine, vous parlez, lisez, écrivez… Vous reconnaissez vos proches, les situations de danger, vous savez où aller pour manger, pour vous sentir à l'abri... Mais vous avez une histoire unique, liée à tout un ensemble d'évènements qui vous sont arrivés et cette histoire unique influence votre manière d'interagir avec votre environnement actuel. De ces évènements de votre histoire, vous avez appris quelque chose.

La mémoire est ce qui explique l'influence de l'expérience sur le comportement (Rudy 2014). Larry Squire (1987, cité dans Rudy 2014 p.3) définit l'apprentissage et la mémoire ainsi :

> *L'apprentissage est le processus d'acquisition de nouvelles informations, tandis que la mémoire est la persistance de cet apprentissage sous une forme qui lui permette de se manifester par la suite.* [1]

L'influence des expériences passées sur le comportement présent – la mémoire donc – est permise par un ensemble de processus mesurables au cœur du cerveau : le cerveau a la capacité d'encoder, conserver et rappeler un ensemble d'informations d'une manière qui va influencer le comportement. Etudier la mémoire revient donc à poser deux questions : (1) quels sont les mécanismes qui permettent au cerveau de mémoriser des informations de son environnement et des situations auxquelles il est confronté, et (2) comment et dans quelle mesure ces informations retenues, ces souvenirs, modifient-ils le comportement de l'individu.

2. Des systèmes de mémoire multiples

a. Les différents types de mémoire

Il est important de préciser ici l'étendue de la mémoire : les types d'informations que l'on peut acquérir sont très variés (voir aussi Figure 2). La mémoire telle qu'on y réfère dans la vie de tous les jours est une mémoire dite explicite, ou mémoire déclarative. C'est la mémoire qui permet de raconter la dernière fois que nous sommes allés au cinéma, du film que l'on a vu, avec qui on y est allé, et s'il faisait encore jour lorsqu'on est sorti de la salle. Cette mémoire est la mémoire d'un épisode, un évènement de la vie dans son contexte et sa temporalité, et est appelée mémoire épisodique ou mémoire autobiographique. La mémoire explicite est également celle qui me permet de savoir que la Saint Valentin est le 14 février et que j'ai 3 sœurs. Cette mémoire est alors dite sémantique, c'est la mémoire des connaissances générales sur le monde.

Mais nous acquérons également d'autres informations qui seront mémorisées de manière implicite, non-déclarative, c'est-à-dire que ces informations seront utilisées sans faire appel à un rappel conscient. Parmi ces mémoires, on compte par exemple la mémoire procédurale, ou mémoire

[1] "Learning is the process of acquiring new information, while memory refers to the persistence of learning in a state that can be revealed at a later time."

des savoir-faire. C'est la mémoire qui me permet de faire des pas de rock sans y faire attention quand je vais danser, ou de faire du vélo. Un autre type de mémoire implicite est la mémoire d'amorçage. C'est la mémoire qui aide à lire de manière fluide par exemple : il sera plus facile de lire « des chiens et des chats » que « des chiens et des verres » parce que les chiens et les chats sont plus souvent associés dans notre expérience que les chiens et les verres. L'expérience influence aussi notre perception : un musicien aura plus de facilité à déceler une fausse note qu'un non-musicien. Cette mémoire est la mémoire perceptive. Enfin, l'expérience peut influencer notre réponse comportementale par des conditionnements associatifs classiques (le fait de craindre le bourdonnement de l'abeille quand on a déjà été piqué par exemple) ou par des apprentissages non associatifs de type habituation (comme le fait que vous ne sentez plus vos vêtements qui vous touchent pourtant toute la journée).

Ainsi, la mémoire telle que définie précédemment peut s'exprimer de plusieurs manières. On parle de systèmes de mémoire multiples (Squire 2004).

b. Des expériences fondatrices dans l'étude des systèmes de mémoire multiples

Ces distinctions entre ces différents types de mémoire n'ont pas toujours été évidentes et ont été montrées par des expériences fondatrices. Si plusieurs auteurs ont suggéré l'existence de différents systèmes de mémoire dès le début du XIX^{ème} siècle (Maine de Biran, William James, Bergson, voir Squire 2004 pour un bref historique), une des premières démonstrations de l'indépendance de ces mémoires est faite en 1911 : Edouard Claparède (expérience décrite dans Claparède 1995) décrit alors une patiente amnésique (B.S.) qu'il examinait régulièrement. Celle-ci avait perdu la capacité à former de nouveaux souvenirs et ne reconnaissait pas d'une fois sur l'autre la personne qui l'examinait. Un jour, il cache une épingle entre ses doigts et pique la patiente avec l'épingle lorsqu'il lui serre la main. Plus tard, lorsqu'il cherche à lui serrer de nouveau la main, la patiente refuse, sans pour autant être capable d'expliquer son refus. Bien qu'elle ne se souvienne pas de l'épisode douloureux en lui-même, elle a été capable d'associer inconsciemment le fait de serrer la main de Claparède à une douleur et cherche maintenant à l'éviter. Cette première étude met en avant pour la première fois la possibilité d'altération d'un type de mémoire (ici la mémoire épisodique), sans que d'autres types soient altérés (ici le conditionnement classique).

Un pas en avant plus grand encore dans la compréhension du fonctionnement de la mémoire a été fait en 1957 lorsque Brenda Milner et William Beecher Scoville décrivirent le cas du patient Henry G. Molaison (plus connu sous le nom de patient H.M.). H.M. souffrait d'épilepsie depuis l'âge de 10 ans et à l'âge de 27 ans ses crises étaient devenues extrêmement graves et handicapantes et il fut convenu d'une chirurgie pour réséquer le foyer épileptogène. La chirurgie visait à retirer les deux lobes temporaux médians et fut un succès quant aux crises, qui s'avérèrent bien moins handicapantes qu'auparavant, mais elle entraina une perte de mémoire majeure. Scoville et Milner (1957) décrivent les symptômes de leur patient ainsi :

> *Après l'opération, ce jeune homme [H.M.] ne reconnaissait plus le personnel de l'hôpital, ne pouvait plus trouver les toilettes, et il semblait ne se souvenir d'aucun évènement de sa vie de tous les jours à l'hôpital. Il présentait aussi une amnésie rétrograde partielle puisqu'il ne se souvenait pas du décès de son oncle préféré 3 ans auparavant, ni de quoique ce soit concernant son séjour à l'hôpital, mais se souvenait d'évènements triviaux qui avait eu lieu juste avant son admission à l'hôpital. Ses souvenirs plus anciens semblaient vivides et intacts.*[2]

Au cours de sa vie, le patient H.M. participe à de très nombreuses expériences de neuropsychologie qui ont permis de caractériser plus précisément ses déficits. Il a pu être montré que, s'il est devenu incapable de mémoriser des évènements de sa vie quotidienne, il se souvient d'évènements anciens, mais est également capable de se rappeler de tâches motrices procédurales et d'en apprendre de nouvelles (Corkin 1968), de subir un conditionnement classique et de développer un apprentissage perceptif (Annese et al. 2014). Par conséquent, H.M. a conservé certaines capacités mnésiques et en a perdu d'autres.

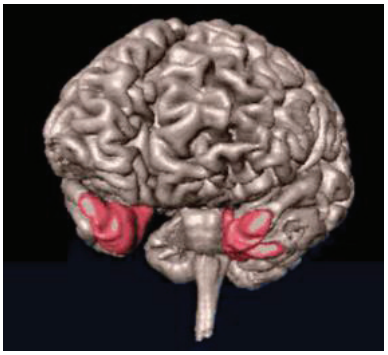


Figure 1 : Reconstitution 3D du cerveau du patient HM (thebrainobservatory.org). Les zones en rouges représentent le tissu retiré lors de la chirurgie de H.M. en 1953, et telles qu'analysées post-mortem (figure par The Brain Observatory UC San Diego d'après Annese et al. 2014).

Cet exemple démontre que le type d'information à mémoriser est important pour le cerveau et définit les régions cérébrales qui seront impliquées : raconter ce que nous avons fait la veille n'implique pas les mêmes réseaux neuronaux que faire du vélo, ou que s'éloigner d'une abeille quand on a déjà été piqué. De manière importante, et contrairement aux patients amnésiques étudiés avant lui, l'étendue de la lésion cérébrale de H.M. est connue puisque délimitée par le chirurgien (autant qu'elle puisse l'être avant l'avènement de l'imagerie). Selon les plans de chirurgie de Scoville, la lésion incluait une majeure partie de l'hippocampe, de l'amygdale et des régions adjacentes du néocortex telles que les cortex entorhinal, périrhinal et parahippocampal. Bien que des études en imagerie par résonnance magnétique et d'autres études post-mortem aient révélé que la lésion était en fait plus localisée qu'initialement suggéré (une partie importante de l'hippocampe avait été épargnée par la lésion, Annese et al. 2014), le patient H.M. devint un des premiers patients pour lesquels les déficits mnésiques pouvaient être corrélés à un dommage cérébral localisé. L'étude de son cas permet donc pour la première fois de faire un lien entre une région cérébrale, le lobe temporal médian, et une fonction mnésique particulière, la mémorisation d'épisodes.

[2] "After operation this young man could no longer recognize the hospital staff nor find his way to the bathroom, and he seemed to recall nothing of the day-to-day events of his hospital life. There was also a partial retrograde amnesia, inasmuch as he did not remember the death of a favourite uncle three years previously, nor anything of the period in hospital, yet could recall some trivial events that had occurred just before his admission to the hospital. His early memories were apparently vivid and intact."

Au fur et à mesure des expériences réalisées à la fois chez l'homme et chez l'animal, les structures cérébrales impliquées dans les différents types de mémoire ont ainsi pu être précisés. Des structures clés impliquées dans les différents types de mémoires présentés plus haut sont indiquées Figure 2. Ce type de schéma est extrêmement simplifié. Il serait illusoire de réduire un type de mémoire à une structure cérébrale unique. De plus, les différents types de mémoire ne fonctionnement pas de manière indépendante : ils interagissent et se complètent pour permettre à l'organisme d'interagir avec son environnement de la manière la plus adaptée possible. Ainsi, si je devais vous raconter mon premier cours de danse, je pourrais vous décrire la salle et la professeure. Je ferais là appel à ma mémoire épisodique. Mais je pourrais aussi dire comment s'appelle la professeure, ou le lieu, ce qui ferait appel à ma mémoire sémantique. Enfin, je pourrais vous montrer quelques pas de danse que j'y ai appris, ce qui relèverait de ma mémoire procédurale. L'ensemble des structures cérébrales permettant le rappel de ces mémoires travaillerait donc en parallèle.

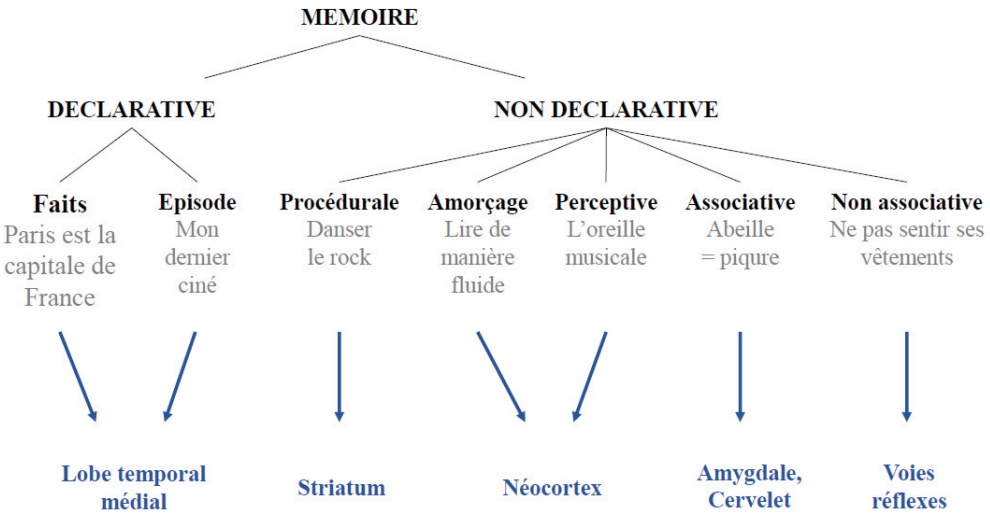


Figure 2: Les systèmes mnésiques et les structures clés dans leur fonctionnement, adapté de Squire (2004).

c. A la recherche d'un modèle expérimental, la mémoire associative et Pavlov

La psychologie expérimentale a développé un ensemble de tâches pour étudier indépendamment les différents types de mémoires. Ainsi, lorsque le patient H.M. a été décrit, il a semblé important de comprendre plus en détail le rôle du lobe temporal médian dans l'étiologie de son amnésie. Quelles étaient les structures clés dont la lésion conduisait aux déficits de H.M. ?

Pour pouvoir étudier plus en avant la neurobiologie d'un processus, il est très utile et commun d'avoir recours à un modèle animal. Le modèle animal présente l'avantage non négligeable que le chercheur a un contrôle fin de la localisation de la lésion et peut cibler précisément une région plutôt qu'une autre. Il peut donc tirer des conclusions claires quant à l'implication ou non de la zone lésée dans le type de mémoire qui est testé. Toutefois, et en particulier dans le cas de l'amnésie du patient H.M., la difficulté devient alors de définir une procédure qui utilise effectivement la même mémoire que celle qui est endommagée chez l'homme. La tâche n'est pas toujours aisée : il aura fallu attendre la fin des années 70 pour qu'une procédure expérimentale vienne modéliser les pertes mnésiques dramatiques observées chez le patient H.M. en cas de lésion similaire (Gaffan 1974; Mishkin 1978). La procédure est une tâche de non appariement retardé (*delayed non-matching to sample*) et consiste à présenter un stimulus (*sample*) puis, après un délai plus ou moins long, présenter le stimulus et un nouveau stimulus. Le sujet doit alors choisir l'item qui ne lui a pas encore été présenté pour obtenir

une récompense. Une telle tâche a permis de comprendre plus précisément les rôles respectifs de l'hippocampe et des régions adjacentes.

Je ne m'étendrai pas plus sur le cas du patient H.M., de la mémoire épisodique et des études chez l'homme et l'animal visant à comprendre le fonctionnement de cette mémoire. Il s'agit là d'un sujet très vaste, encore largement à l'étude, et en dehors du sujet qui nous intéresse ici. Un autre type de mémoire nous concerne plus : la mémoire associative. Cette mémoire permet de faire le lien entre des évènements, objets ou stimuli distincts. Elle me permet d'associer une odeur spécifique à du pain grillé, d'appuyer machinalement sur mon réveil quand il sonne le matin et de serrer fortement les freins de mon vélo quand une voiture me coupe le chemin. Cette mémoire est le reflet d'un apprentissage inconscient et influence mon comportement sans que je la rappelle de manière volontaire, elle fait partie des mémoires non-déclaratives, implicites.

Les premières études systématiques de la mémoire associative remontent probablement à Thorndike (1898): dans ses études, un animal comme un chat ou un poulet est placé dans une cage de laquelle il peut voir un bol de nourriture mais ne peut pas y accéder. Pour sortir de la cage et accéder à la nourriture, l'animal doit ouvrir la porte à l'aide d'un mécanisme comme un levier. Rapidement, l'animal apprend à associer le levier avec l'ouverture de la porte. Le temps nécessaire à l'animal pour ouvrir la cage est enregistré : lorsque l'association est bien faite, l'ouverture de la porte ne prend qu'un temps très court, largement reproduit d'un essai à l'autre. Cette étude marque le début des études standardisées de la mémoire associative, c'est-à-dire dans lesquelles la subjectivité de l'expérimentateur n'influence pas le résultat et des résultats sensiblement identiques peuvent être obtenus par des expérimentateurs différents. Toutefois, cette étude comprend une réponse instrumentale et ne permet pas d'étudier directement, de manière simple, une association entre deux stimuli.

L'étude de la mémoire associative non instrumentale a commencé au début du siècle dernier, avec Ivan Pavlov (1927). En s'appuyant sur le travail de Descartes trois siècles auparavant, qui définit l'idée de *réflexe* comme une réaction nécessaire de l'animal à un stimulus extérieur, il définit la notion de *réflexe conditionné.* A plusieurs reprises, Pavlov présente le son d'un métronome à un chien, à la suite duquel il lui donne de la nourriture. Il montre ensuite que la présentation du son du métronome suffit à elle seule à stimuler la salivation du chien. Cette salivation n'était auparavant stimulée que par l'introduction de nourriture dans la bouche du chien. La nourriture est alors un *stimulus inconditionné* (SI), puisqu'elle induit naturellement la salivation, alors que le son du métronome devient le *stimulus conditionné* (SC), c'est à dire le signal déclenchant un *réflexe (ou réponse) conditionné* de salivation. Un conditionnement associatif entre le SC et le SI est appelé un *conditionnement pavlovien*.

Nous allons voir dans le paragraphe suivant que ce type de conditionnement associatif sous-tend la mémoire émotionnelle : un stimulus naturellement émotionnel (SI) est associé à un stimulus initialement émotionnellement neutre (SC) et lui transfert sa valence.

II. La mémoire émotionnelle

1. Les émotions

> *Pour certains, les émotions sont des réponses corporelles qui ont évolué pour favoriser la survie. Pour d'autres, les émotions sont des états mentaux qui surviennent lorsque le cerveau perçoit des réponses corporelles. Un autre point de vue suggère que les réponses corporelles sont secondaires à l'émotion, les choses importantes se passant entièrement dans le cerveau.*[3] *(LeDoux 1996)*
>
> *Tout le monde sait ce qu'est une émotion jusqu'à ce qu'on demande d'en donner une définition.*[4] *(Fehr and Russell 1984)*

D'après Fehr et Russel (1984), le concept d'émotion n'accepterait pas de définition stricte mais aurait des limites floues. Les auteurs soulignent ainsi une idée de Rosch stipulant que de nombreux concepts de la vie de tous les jours, tels qu'un fruit, un jeu ou un outil, ne peuvent être strictement définis par des attributs ou des caractéristiques comme le ferait un dictionnaire. De tels concepts s'organisent plutôt autour de *prototypes*, des exemples clairs et manifestes, consensuels, de fruits, de jeux ou d'outils, et un nouvel item entrerait alors dans le concept selon sa proximité, son degré de ressemblance, avec le prototype. Ainsi, une pomme serait un exemple prototypique de fruit alors qu'une olive ou une noix de coco, moins adjacents, feraient moins l'unanimité quant à déterminer s'ils sont des fruits. Selon Fehr et Russel (1984), une émotion se définit ainsi de manière prototypique plutôt que par des caractéristiques. Cette vision semble confirmée par l'Histoire : depuis l'Antiquité, un grand nombre de philosophes, psychologues, linguistes, neurobiologistes et penseurs ont cherché à définir le concept d'émotion (ou de passion, selon l'époque). Platon, Aristote, Saint Thomas d'Aquin, Descartes, Hobbes, Hume, Spinoza, Kant, James, Cannon, Arnold, Tomkins, Ekman, Ledoux, Scherer, Damásio, pour n'en nommer que quelques-uns, s'y sont par exemple essayé. Si les théories sur la nature des émotions et la manière de les définir sont nombreuses, nulle ne semble faire consensus.

D'autres points par contre semblent faire consensus. Ainsi, quelle que soit la manière de définir une émotion, quelques-unes semblent entrer pour tous dans le concept. Certains auteurs tels que Tomkins, Ekman ou Plutchik y font référence comme étant des émotions de base (une meilleure traduction serait "fondamentales" ; pour un historique, voir LeDoux 1996). Ainsi la joie, la peur ou la colère sont très régulièrement mentionnées comme en faisant partie : il pourrait s'agir d'émotions prototypiques (Fehr and Russell 1984). Un autre point qui semble aider à la définition de l'émotion est la réaction qu'elle génère pour l'organisme qui l'exprime : une émotion induirait, pour beaucoup, si ce n'est la majorité des auteurs ayant disserté sur le sujet, une réponse de l'organisme, comportementale et/ou neuro-végétative (pâleur, rougissement, accélération du pouls, palpitations, sensation de malaise, tremblement, incapacité de bouger ou agitation,…). Les neurobiologistes ayant travaillé sur le sujet ajoutent ici qu'une émotion induit également une modification de l'activité cérébrale. Enfin, un grand nombre d'auteurs ayant travaillé sur les émotions ont souligné l'importance de l'expérience consciente de l'émotion (Damásio 2003; LeDoux 2014; Makowska and Weary 2013). Je reviendrai sur ce point dans le cas de la peur.

---

[3] "For some, emotions are bodily responses that evolved as part of the struggle to survive. For others, emotions are mental states that result when bodily responses are "sensed" by the brain. Another view is that bodily responses are peripheral to an emotion, with the important stuff happening completely within the brain."

[4] "Everyone knows what an emotion is until asked to give a definition."

Je vais prendre le parti ici, que d'autres ont pris avant moi (LeDoux 1996; Damásio 2003), de considérer les émotions non en tant que sentiments conscients mais plutôt comme des réponses physiologiques et comportementales contrôlées par le cerveau qui ont été favorisées par l'évolution parce qu'elle permettent la survie et la procréation. Toutefois, différentes émotions ne sont vraisemblablement pas contrôlées par un système unique : la peur, la colère, la joie, le désir sont supportées par des réseaux neuronaux différents. Il nous faut donc considérer les différentes émotions comme des phénomènes indépendants, et les étudier séparément. Dans le cadre qui nous intéresse, nous nous sommes intéressés à la peur.

2. La peur

Dans la vie de tous les jours, le terme de « peur » désigne une expérience consciente qui se produit lorsque l'on est menacé. Toutefois, cette définition n'est généralement pas celle qui est utilisée lorsqu'on parle de peur en neurosciences (LeDoux 2014).

> *J'ai pris soin de ne rien dire ici au sujet de la peur parce que je pressens que nous devrions laisser ce concept torturé tranquille pour un temps et essayer d'avancer sans. Toutefois, s'il s'avère nécessaire d'introduire le terme, j'aimerais le voir utilisé à la manière de Rescorla et Solomon (1967), c'est-à-dire pour faire référence à une caractéristique du comportement instrumental. La restriction du répertoire comportemental d'un animal à un petit ensemble de réactions de défense espèce-spécifique pourrait être une caractéristique appropriée.*[5] *(Bolles 1970)*

Comme le précise Bolles, l'utilisation du mot peur en sciences, s'il est utilisé, doit adopter une définition stricte, qui se limite à un ensemble de faits observables. Dans ce sens, la peur n'est pas un sentiment, elle n'est pas nécessairement accompagnée d'une expérience consciente de l'émotion. Dans le cadre de ce manuscrit, par soucis de simplicité de lecture et d'écriture, j'utiliserai le mot « peur » pour faire référence à l'état neurophysiologique non subjectif induit par un stimulus aversif et induisant une réponse de défense. Le « sentiment de peur » fera au contraire référence à l'état subjectif rapporté par un sujet en tant qu'expérience consciente. Cette formulation est proche de celle proposée par Damásio (2003). Dans le cadre d'un travail sur l'animal, ce sentiment de peur, s'il existe, ne peut pas être mesuré.

Parmi les émotions favorisées par l'évolution, la peur est sûrement une des plus largement partagées dans l'arbre phylogénique : elle permet à l'organisme de répondre de manière adéquate à une situation qui met sa survie en danger. Par conséquent, elle favorise sa survie et sa reproduction.

On distingue classiquement deux grands types de peur: la peur innée, inconditionnée, et la peur apprise, conditionnée. La peur inconditionnée permet une réponse adaptée de l'organisme dès la première fois qu'il rencontre un danger. La peur du prédateur, par exemple, est une peur inconditionnée chez de nombreux organismes (Blanchard and Blanchard 1988; Blanchard et al. 1990; Wiedenmayer 2009). De la même manière, lorsqu'un individu reçoit un stimulus nociceptif, comme par exemple un choc électrique, il sursaute, s'éloigne spontanément de la source du choc, voire attaque l'objet qui a délivré le choc (Blanchard and Blanchard 1969b; Blanchard et al. 1976; Collier and

[5] "I have been careful to say nothing here about fear because I suspect we should let that tortured concept rest awhile and try to get along without it. However, if it is felt necessary to introduce the term, I would like to see it used as Rescorla and Solomon (1967) used it, that is, to refer to some observed feature of instrumental behavior. The restriction of the animal's behavioral repertoire to a narrow set of SSDRs might just be an appropriate feature."

Bolles 1980). Les stimuli inconditionnés varient d'une espèce à l'autre mais sont généralement des prédateurs, ou des individus de la même espèce présentant un danger pour l'intégrité du sujet, des stimuli douloureux (comme un choc électrique, un pincement, une coupure,…) ou des stimuli intenses et soudains (un éclair, un son très fort,…).

La peur conditionnée (ou peur apprise) à un stimulus, au contraire, n'est pas exprimée la première fois que le sujet est confronté au stimulus en question mais est induite par un apprentissage de type pavlovien. Un stimulus initialement neutre acquiert une signification de menace après avoir été associé à un SI capable de générer une peur inconditionnée : il s'agit alors de mémoire émotionnelle.

3. La mémoire émotionnelle et le conditionnement de peur

En 1920, John Watson et Rosalie Rayner (1920) décrivent une expérience mené sur Albert B., un enfant de 11 mois : Albert est de tempérament égal et ne pleure presque jamais. Lorsqu'on lui présente des jeux, de nouveaux objets ou des animaux qu'il ne connait pas, il fait preuve de curiosité et les manipule. C'est cette réaction qu'il développe également la première fois qu'on lui présente un rat blanc. L'expérience consiste à associer systématiquement le fait de toucher le rat au son fort d'une barre d'acier frappée avec un marteau. Lorsque la barre est frappée, Albert sursaute violemment et se met à pleurer. Après plusieurs associations de ce type, le rat est présenté seul : au moment même où il est présenté, Albert commence à pleurer. Cette réaction d'Albert lorsque le rat est présenté persiste longtemps : un mois plus tard, il inhibe son exploration naturelle en présence de l'animal et cherche à s'éloigner du rat. Watson et Rayner appellent cette réponse une « réaction émotionnelle conditionnée » : Albert a associé le rat au son violent de la barre d'acier frappée et y répond maintenant par un ensemble de comportements de défense. C'est un exemple de mémoire émotionnelle.

Cette mémoire est également présente chez les animaux. Un conditionnement classique consiste à associer un son à un choc électrique léger aux pattes de l'animal. Après quelques associations de ce type, l'animal exprime un ensemble de comportement de défense au son (immobilité, augmentation des hormones de stress, analgésie…). Comme Albert, l'animal a associé un stimulus initialement neutre, sans valeur affective particulière, à l'occurrence d'un stimulus qui induit une réponse de défense inconditionnée. On parle de conditionnement de peur. Les stimuli conditionnés utilisables dans un conditionnement sont de nature très variables. Chez le rat, la vaste majorité des études utilisent un stimulus auditif ou visuel. Les études présentées dans cette thèse utiliseront un stimulus olfactif. On parle alors de conditionnement de peur à l'odeur.

Le conditionnement de peur à l'odeur présente de nombreux avantages : tout d'abord, pour un rat, l'olfaction est la modalité sensorielle privilégiée pour explorer l'environnement. On dit de lui que c'est un macrosmate. De plus, contrairement aux modalités visuelles et auditives, l'olfaction est fonctionnelle dès la naissance chez le rat, ce qui permet d'étudier l'ontogenèse de la mémoire en utilisant un paradigme identique tout au long de la vie. Enfin, les odeurs sont des stimuli particuliers dans le cadre de la mémoire émotionnelle : l'information olfactive a un accès privilégié aux structures impliquées dans les émotions et la mémoire émotionnelle puisque le bulbe olfactif, le premier relais cérébral de l'information olfactive, se projette directement sur l'amygdale, une structure clé des émotions. Cette caractéristique du système olfactif fait des odeurs des stimuli particulièrement puissants pour rappeler des souvenirs : chez l'homme, les souvenirs rappelés par des odeurs sont plus détaillés et plus émotionnels que ceux évoqués par d'autres modalités sensorielles (pour revue, voir

Saive 2015). L'ensemble de ces caractéristiques fait de l'olfaction un sens privilégié pour étudier l'ontogenèse du conditionnement de peur à l'odeur et seront détaillés dans le chapitre suivant.

Chapitre 2

La neurobiologie du conditionnement de peur à l'odeur

Ainsi que nous l'avons vu plus haut, le conditionnement de peur à l'odeur consiste à associer de manière répétée une odeur à un SI aversif comme un choc électrique modéré. Dans un tel conditionnement, le sujet apprend que l'odeur prédit l'arrivée du choc. Je vais ici décrire le système olfactif qui permet la perception et le traitement de l'information olfactive, puis les réseaux neuronaux du conditionnement de peur de manière générale et du conditionnement de peur à l'odeur en particulier.

I. Percevoir et traiter le stimulus olfactif

Dans la grande histoire de l'évolution, l'olfaction est un des sens les plus archaïques. Il permet la perception de composés chimiques volatils, les odorants, et régit chez le mammifère des comportements aussi divers que la prise alimentaire (Palouzier-Paulignan et al. 2012), la reconnaissance sociale (Carr et al. 1976; Singh and Tobach 1975; Hofer et al. 1976), la reproduction (Heimer and Larsson 1967; Edwards et al. 1996) ou encore le comportement maternel (Lévy and Keller 2009; Corona and Lévy 2015; Lonstein et al. 2015).

Le système olfactif des rongeurs peut être divisé en plusieurs grands ensembles présentés ici selon l'organe sensoriel périphérique impliqué (voir Figure 3):

- l'épithélium olfactif, qui se projette sur le bulbe olfactif principal
- l'organe voméronasal, qui se projette sur le bulbe olfactif accessoire
- l'organe septal de Masera qui se projette sur des glomérules localisés du bulbe olfactif principal
- le ganglion de Grueneberg, qui se projette sur les glomérules en collier à la base du bulbe.

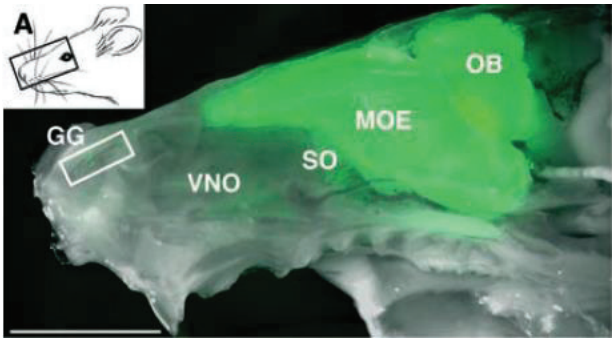


Figure 3 : Marquage du système olfactif par la GFP (Green Fluorescent Protein) sous le promoteur du gène OMF (Olfactory Marker Protein). On y voit, du plus rostral au plus caudal le ganglion de Grueneberg (GG), l'organe voméronasal (VNO), l'organe septal de Masera (SO) et la muqueuse olfactive (MOE). L'ensemble de ces organes sensoriels du système olfactif se projettent sur les bulbes olfactifs (OB) principaux et/ou accessoires (Brechbühl et al. 2008).

Ces trois dernières structures présentent la particularité de détecter certains types d'odorants bien particuliers comme les phéromones d'alarme pour le ganglion de Grueneberg, les odeurs non volatiles à caractère social comme les phéromones sexuelles pour l'organe voméronasal, ou de jouer le rôle de détecteur précoce d'odeurs dû entre autres à la mécanosensibilité de certains de ses récepteurs comme l'organe de Masera (Ma 2010). Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons en particulier au système olfactif principal. Son organisation fonctionnelle a été largement décrite dans des revues de synthèses et d'autres thèses sur lesquelles je me suis appuyée pour rédiger cette partie (Firestein 2001; Mori et al. 1999; Ressler et al. 1994; Shipley and Ennis 1996; Wilson and Sullivan 2011; Buron 2009; Courtiol 2012; Hegoburu 2012; Saive 2015; Sevelinges 2006).

1. La fixation de l'odorant sur la muqueuse

Lorsqu'un individu respire, un ensemble d'odorants pénètre la cavité nasale à chaque inspiration. Une fois inhalés, les odorants entrent en contact avec l'épithélium olfactif qui tapisse la paroi des cornets olfactifs (voir Figure 4). Cet épithélium contient des neurones olfactifs ciliés responsables de la transformation du signal chimique odorant en signal électrique. Lorsque les molécules odorantes atteignent la muqueuse olfactive, elles se fixent sur les récepteurs olfactifs transmembranaires présents sur les cils des neurorécepteurs (Shipley and Ennis 1996; Firestein 2001).

Il y a, chez le rat, environ un millier de récepteurs aux odorants qui sont codés par la plus grande famille de gènes existant[6] (Buck and Axel 1991). La fixation d'un odorant sur un récepteur déclenche une cascade moléculaire et génère un potentiel d'action qui est alors transmis via l'axone du neurorécepteur jusqu'au bulbe olfactif, premier relais de l'information olfactive. Chaque neurorécepteur exprime un seul type de protéine réceptrice aux odorants, qui est sensible aux propriétés structurales des molécules odorantes (groupes fonctionnels, cycles, nombres de carbones,…). De par ses différentes propriétés structurales, un odorant active donc une combinaison spécifique de neurorécepteurs et cette combinaison d'activation constitue l'information olfactive (Duchamp-Viret et al. 1999; Malnic et al. 1999).

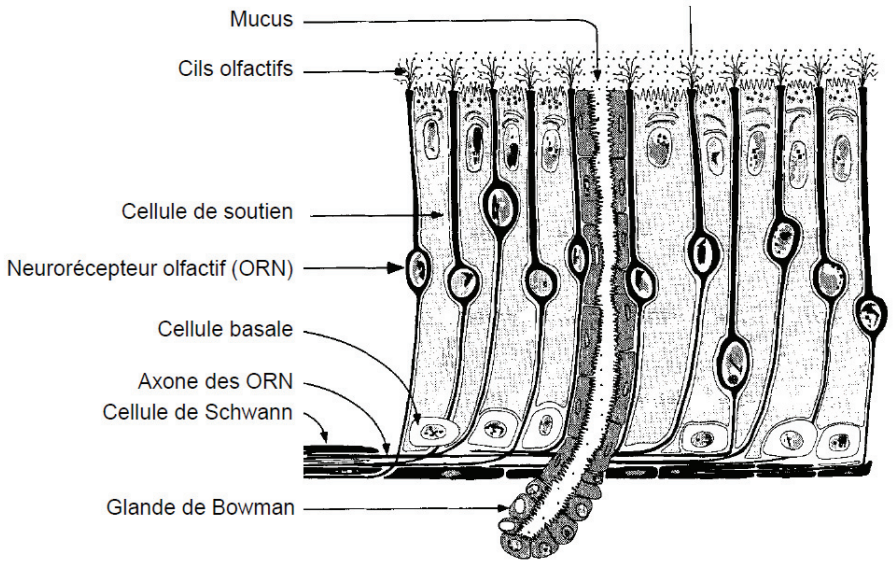


Figure 4 : Structure de l'épithélium olfactif vu en coupe : les neurorécepteurs olfactifs sont entourés de cellules de soutien et de cellules basales dans la partie la plus profonde de l'épithélium. Ces cellules basales peuvent se différencier en nouveaux neurorécepteurs olfactifs et permettent leur renouvellement. Les cils des neurones olfactifs baignent dans du mucus généré par les glandes de Bowman, situées dans la couche profonde de l'épithélium (chorion) (Adapté de Shipley and Ennis 1996).

[6] Prix Nobel physiologie ou médecine à Axel et Buck en 2004

2. L'influx de l'information vers le bulbe olfactif: un premier traitement

Les axones des neurones sensoriels olfactifs sont rassemblés au sein de nerfs olfactifs et traversent la lame criblée de l'os éthmoïde qui sépare la cavité nasale du cerveau. Là, ils se projettent au niveau du bulbe olfactif, premier relai de l'information olfactive. Le bulbe est une structure paire laminaire à six couches de cellules organisées de manière concentrique (voir Figure 5 et Figure 6 pour le détail des différentes couches cellulaires). Les axones des neurorécepteurs sensoriels se projettent sur le bulbe au niveau de la couche glomérulaire, les neurones exprimant les mêmes récepteurs aux odeurs se projetant sur les mêmes glomérules (Ressler et al. 1994). Là, l'information olfactive passe donc des axones des neurones olfactifs vers les cellules mitrales et à panache au niveau des glomérules. L'activité des cellules mitrales et à panache est contrôlée par un ensemble d'interneurones dont les cellules granulaires, présentes dans la couche la plus profonde du bulbe. Les axones des cellules mitrales et à panache se regroupent et forment le tractus olfactif latéral qui permet d'acheminer l'information olfactive vers les structures supérieures.

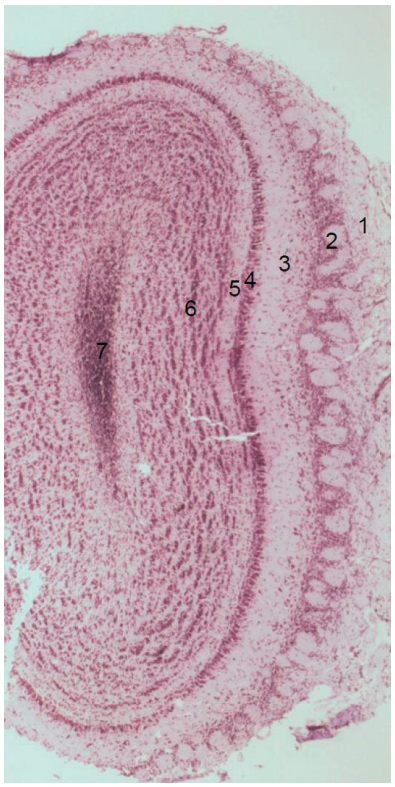


Figure 5 : Photo d'une coupe de bulbe olfactif de raton (PN12) colorée au violet de crésyl. L'organisation en couches concentriques (1-nerfs olfactifs, 2- glomérules, 3- plexiforme externe, 4- cellules mitrales, 5- plexiforme interne et 6- cellules granulaires) est bien visible. Au cœur du bulbe, on peut observer la zone sub-épendymale (7) qui contient les cellules souches issues du flux migratoire rostral dont sont issus les progéniteurs de certaines cellules du bulbe. Cette zone est quasi-inexistante chez le rat adulte mais très développée au cours de l'ontogenèse précoce ainsi qu'on peut le voir sur la coupe présentée ici.

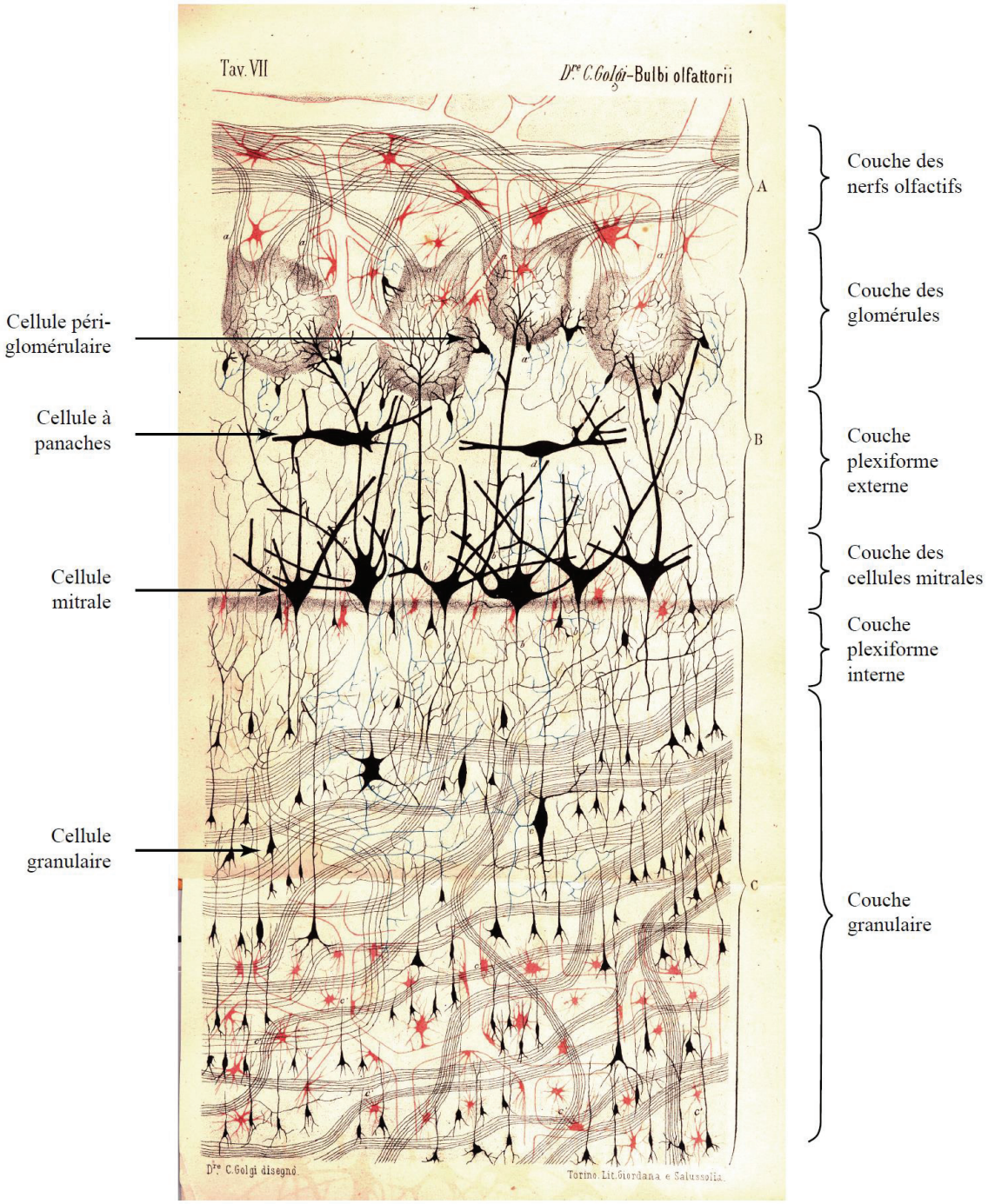


Figure 6 : Dessin d'une coupe de bulbe olfactif de chien par Camillo Golgi, 1875 (propriété du Dr. Paolo Mazzarello, University of Pavia, Department of Experimental Medicine, Section of General Pathology). Les axones des neurones sensoriels arrivent via la couche la plus extérieure du bulbe et font synapse au niveau de la couche glomérulaire avec les cellules mitrales et cellules à panache. Les glomérules sont un lieu privilégié de contact synaptique dans lesquels la diffusion des neurotransmetteurs est physiquement limitée par les cellules périglomérulaires et cellules à axones courts qui les entourent. Sous la couche glomérulaire, la couche plexiforme externe contient les somas des cellules à panaches, et encore en dessous se situe la couche des cellules mitrales, qui contient leurs somas. La couche granulaire est la couche la plus profonde du bulbe et contient les somas des cellules granulaires. Ces cellules sont des interneurones inhibiteurs qui font synapses sur les dendrites secondaires des cellules mitrales dans la couche plexiforme externe.

3. La respiration : flairage et modulation de l'activité des neurones du bulbe olfactif

La perception des odeurs est permise par le flux d'air parcourant la cavité nasale, l'inspiration amenant les molécules odorantes de l'extérieur au contact de la muqueuse olfactive. Chez le rat, comme chez l'homme de façon plus restreinte, la perception olfactive est grandement facilitée par la modulation de la respiration. L'échantillonnage de l'odeur par la modulation de la respiration est appelée flairage (*sniff*). Il est caractérisé par une augmentation du débit et de la fréquence de la respiration et régule la dynamique temporelle et la concentration des odorants qui atteignent la muqueuse olfactive.

La respiration est indispensable à la perception des odeurs : lorsque le flux d'air est interrompu dans la cavité nasale, que ce soit par apnée ou par trachéotomie, la perception olfactive n'est pas possible. Au contraire, si un flux d'air est imposé dans le nez, il active les neurorécepteurs olfactifs. Chez l'homme, la respiration est également modulée lorsque l'on cherche à imaginer une odeur : ses caractéristiques sont modifiées par l'effort d'imagerie mentale et une tâche d'imagerie est plus compliquée s'il est demandé de la faire en apnée (Bensafi et al. 2003). Les variations de flairage modulent la représentation neuronale au niveau du bulbe en modifiant à la fois l'activité unitaire des cellules mitrales et à panache et l'activité populationnelle (Buonviso et al. 2006; Courtiol 2012).

Comme précisé plus haut, les neurorécepteurs exprimant le même récepteur aux odeurs convergent sur un même glomérule. Par ailleurs, la respiration module dans le temps l'activité des glomérules. L'activation de l'ensemble des glomérules associés à un odorant crée donc une carte d'activation spatio-temporelle spécifique de cet odorant à l'intérieur du bulbe olfactif qui est ensuite transmise aux cortex olfactifs.

4. Le traitement de l'information par le cortex olfactif primaire

Le cortex olfactif primaire regroupe l'ensemble des structures qui reçoivent des projections directes du bulbe olfactif via le tractus olfactif latéral. La structure principale de projection du bulbe est le cortex piriforme (CP), structure olfactive corticale par excellence. Le CP est un paléocortex à trois couches laminaires qui reçoit les afférences du bulbe sur ses cellules pyramidales (voir Figure 7).

Le CP reçoit donc des informations olfactives du bulbe sous forme de cartes spatio-temporelles d'activation des glomérules. Le cortex piriforme n'est toutefois pas homogène : il est divisé entre une partie antérieure et une partie postérieure. Les inputs que ces sous-structures reçoivent du bulbe sont différents en termes de quantité et de qualité : le cortex piriforme antérieur (CPa) est plus fortement connecté au bulbe olfactif que le cortex piriforme postérieur (CPp). De plus, alors que le CPa reçoit des efférences des cellules mitrales et des cellules à panache, le CPp ne reçoit presque pas d'efférences des cellules à panaches mais contient plus de fibres associatives. Le CPp est également plus connecté au reste du cerveau et se projette sur un ensemble large de structures telles que le thalamus, le néocortex, l'amygdale, l'hypothalamus latéral ou les ganglions de la base. Cette dissociation est anatomique mais également fonctionnelle : les CPa et CPp répondent de manière différente aux odeurs. Le CPa semblerait encoder l'information liée aux propriétés sensorielles de l'odeur et l'habituation, alors que le CPp semble plus impliqué dans la catégorisation des odeurs et la mémoire associative (pour revue, voir Wilson and Sullivan 2011).

Le tractus olfactif latéral permet également l'innervation du noyau olfactif antérieur, du tubercule olfactif, de l'amygdale corticale et médiale et du cortex entorhinal. Ainsi, le bulbe envoie des efférences directement sur des structures associatives importantes comme l'amygdale (mémoire émotionnelle), ou le cortex entorhinal (mémoire multimodale et voie d'entrée de l'hippocampe, impliqué dans les

mémoires contextuelle et épisodique), sans passer par un relai thalamique comme c'est le cas pour la vision ou l'audition. Cette caractéristique fait de l'olfaction une modalité sensorielle privilégiée pour l'étude de la mémoire, et en particulier pour la mémoire émotionnelle.

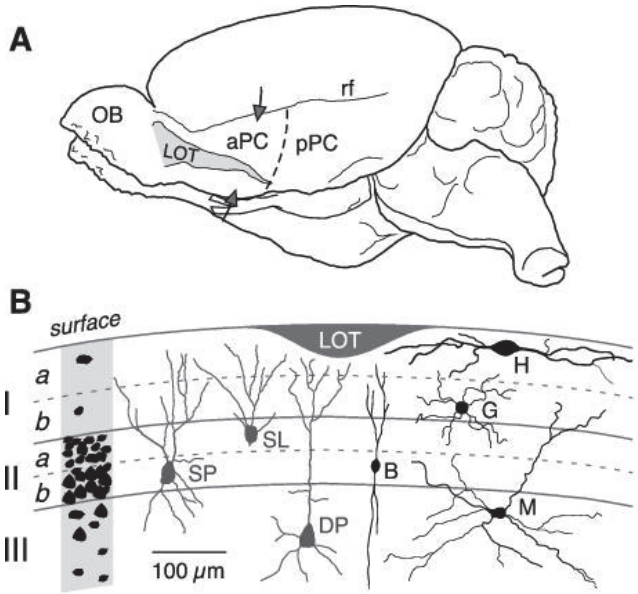


Figure 7 : Organisation du cortex piriforme. A. Vue ventro-latérale d'un cerveau de rat montrant le bulbe olfactif (OB), le tractus olfactif latéral (LOT) qui joint les efférences du bulbe vers le cortex piriforme antérieur (aPC) et postérieur (pPC), délimités dorsalement par la fissure rhinale (rf). B. Les trois couches du cortex piriforme. La couche la plus externe du CP, la couche I, contient les afférences du bulbe dans sa partie la plus superficielle ainsi que des fibres associatives issues des cellules pyramidales et des interneurones inhibiteurs. La couche II contient les somas des cellules pyramidales superficielles (SP) et des cellules semi-lunaires (SL). Enfin, la couche III contient les somas des cellules pyramidales profondes (DP) et une grande variété d'interneurones GABAergiques. Le schéma grisé à gauche des couches représente la densité des somas dans chaque couche. Les cellules noires à droite sont des interneurones (B, bitufted; G, neurogliaforme; H, horizontale; M, multipolaires). (Adapté de Neville et Haberly (2004) par Suzuki and Bekkers 2007)

Nous avons ainsi vu que la perception olfactive était permise par le système olfactif en interaction étroite avec la respiration. Suite au conditionnement de peur à l'odeur, le stimulus initialement neutre acquiert une valence négative grâce à un ensemble de structure que je décris maintenant.

II. Les structures du conditionnement de peur

1. Quelques précisions sur l'étude de la neurobiologie de la mémoire

Lorsque l'on cherche à comprendre comment la trace mnésique est formée et stockée, plusieurs techniques sont disponibles, présentant chacune ses avantages et ses limitations. C'est la combinaison de ces différentes techniques qui permet de mieux comprendre le rôle d'une structure donnée dans la mémoire.

a. La structure est-elle activée par l'apprentissage ?

Mesurer l'activité des structures au cours du conditionnement ou du rappel permet de faire des hypothèses sur leur rôle : une structure plus activée dans un groupe conditionné que dans un groupe contrôle est vraisemblablement impliquée dans le conditionnement. Plusieurs techniques sont utilisées pour mesurer cette activation. Par exemple, l'utilisation d'un marqueur métabolique comme le 2-désoxyglucose (2-DG) radioactif permet de mesurer postmortem les structures qui consomment du sucre (et sont donc activées) au cours d'une période de 45min. La tomographie par émission de positron (TEP) fonctionne également ainsi et ne nécessite pas la mise à mort de l'animal : elle mesure *in vivo* la demande en glucose grâce au marquage radioactif ^{18}F-FDG (fluorodesoxyglucose marqué au fluor 18). L'imagerie par résonnance magnétique fonctionnelle (IRMf) marque également une activité métabolique : elle mesure le signal BOLD, soit un signal lié à l'afflux de sang oxygéné pour répondre à la demande locale en dioxygène des cellules actives. Elle a l'avantage d'avoir une résolution temporelle plus fine que le marquage au 2-DG ou la TEP. Ces différentes techniques métaboliques permettent de visualiser quelles sont les structures cérébrales activées par l'encodage ou le rappel de la trace mnésique et de faire de premières hypothèses sur leur rôle.

Un ensemble de techniques électrophysiologiques permettent également de mesurer l'activité neurophysiologique du cerveau. Ces techniques (électroencéphalographie, enregistrement intracérébral chez l'homme, enregistrement unitaire et/ou populationnel chez l'animal) possèdent une excellente résolution temporelle, voire une bonne résolution spatiale lorsqu'elles sont réalisées de manière intracérébrale. Cette bonne résolution temporelle permet d'avoir accès au décours fin de l'activation des structures cérébrales d'intérêt mais également de suggérer des relations causales entre les activations de plusieurs structures (étude en connectivité fonctionnelle).

b. La structure est-elle modifiée suite à l'apprentissage ?

La trace mnésique en elle-même est vraisemblablement sous-tendue par une facilitation des échanges entre les neurones qui ont été activés par le conditionnement. On parle de plasticité synaptique avec notamment le phénomène de potentialisation à long terme. La démonstration initiale de la potentialisation à long terme (Bliss and Lømo 1973) a montré qu'une brève stimulation à haute fréquence d'une voie neuronale envoyant des informations d'une structure à une autre induit une augmentation importante et durable de l'efficacité de la transmission synaptique. Les neurones cibles acquièrent une plus grande sensibilité à toute stimulation utlitérieure et les synapses restent modifiées pour des semaines voire des mois. Par conséquent, si l'efficacité d'une synapse est modifiée entre avant et après le conditionnement, on peut raisonnablement supposer que la voie neuronale étudiée est impliquée dans la mémoire de ce conditionnement.

La potentialisation à long terme s'accompagne souvent des modifications morphologiques des neurones : les synapses seront plus nombreuses, l'arborescence axonale ou dendritique plus développée,… Ces modifications morphologiques peuvent être mesurées et aider à conclure à l'implication d'une structure dans le stockage de la mémoire.

Pour permettre cette potentialisation à long terme et les modifications morphologiques associées, un ensemble de phénomènes moléculaires sont mis en jeu. Leur mesure permet de faire des hypothèses sur l'implication d'une structure. Lorsqu'un neurotransmetteur tel que le glutamate se fixe sur les récepteurs NMDA (*N-Methyl-D-aspartate*) et AMPA (*α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*), il se produit une entrée de calcium dans la cellule qui favorise à son tour l'activité de kinases (enzymes ajoutant un groupement phosphate sur d'autres molécules) telles que

CamKII, PKAII ou les MAPK qui permettent la phosphorylation de la protéine CREB (*Cyclique adenosin monophosphate Response Binding protein*). CREB phosphorylée (pCREB) peut alors induire l'activation de gènes précoces tels que *c-fos*, ou *Zif268* qui activent à leur tour la transcription de gènes plus tardifs tels que *BDNF* (*Brain Derived Neurotrophic Factor*). Ces gènes tardifs sont responsables des modifications dans l'architecture des neurones et de la synthèse de nouveaux récepteurs aux neurotransmetteurs, ce qui permet la potentialisation à long terme. Dans ces cascades moléculaires, mesurer le niveau d'expression d'un élément (pCREB, c-fos, Zif268, BDNF,…) permet d'estimer dans quelle mesure une structure cérébrale est activée et/ou modifiée suite au conditionnement et est donc impliquée dans la mémoire de ce conditionnement.

c. La structure est-elle nécessaire à la mémoire et dans quelle phase ?

Enfin, une méthode classique pour comprendre le rôle d'une structure cérébrale consiste à la retirer ou la léser et constater les effets sur la mémoire. Si cette ablation ou lésion altère les performances de l'animal dans l'apprentissage étudié, on peut conclure que la structure est probablement impliquée dans la mémoire de cet apprentissage. En parallèle de ces techniques de lésions irréversibles, la technique d'inactivation transitoire par infusion d'un anesthésique local ou d'un agent pharmacologique dans la structure d'intérêt, permet d'inactiver la structure de manière temporaire à différents moments du conditionnement. Par ailleurs, des techniques plus récentes d'activation ou inactivation en utilisant des macromolécules spécifiquement activables par des ligands exogènes (*Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs*, DREADD) ou de la lumière (optogénétique) permettent de raffiner grandement les techniques classiques d'inactivation en agissant non plus sur l'ensemble d'une structure mais sur un type cellulaire donné, voire une voie de projection.

La mémoire comprend plusieurs phases et en particulier les phases d'encodage, de consolidation, de rappel, et de reconsolidation. L'implication d'une structure cérébrale dans le stockage de la trace mnésique peut avoir lieu à une ou plusieurs de ces phases. Ainsi, si l'inactivation d'une structure avant le conditionnement empêche l'expression d'une réponse conditionnée lors d'un test de rappel à 24h, on peut conclure que la structure est impliquée dans l'encodage et/ou la consolidation de la trace mnésique (voir tableau 1). Si, au contraire on inactive la structure immédiatement *après* le conditionnement, c'est la phase de consolidation qui est ciblée de façon plus spécifique. Par ailleurs, on considère qu'une structure est impliquée dans le rappel lorsque son inactivation juste avant le test empêche l'expression de la réponse conditionnée de manière spécifique à l'apprentissage (les autres apprentissages ne seront pas impactés, sinon on peut supposer que la structure est plutôt impliquée dans l'expression de la réponse conditionnée étudiée). Enfin, la reconsolidation est une phase de la mémoire qui aurait lieu lors de la réactivation d'une trace mnésique existante et permettrait la réactualisation de cette trace mnésique lorsqu'elle est rappelée de manière légèrement modifiée. L'inactivation d'une structure après la réactivation d'une mémoire permet donc d'en tester l'implication dans la phase de reconsolidation.

Plusieurs questions peuvent donc être posées pour comprendre le rôle d'une structure dans la mise en mémoire d'une information (activée ? modifiée ? nécessaire ?) et ce n'est que la combinaison de ces questions et des différentes techniques qui y sont associées qui permet de comprendre l'implication de la structure dans le processus mnésique. Je vais maintenant préciser comment ces différentes techniques ont été utilisées pour comprendre la neurobiologie du conditionnement de peur

Tableau 1 : Relation entre le moment d'administration d'une drogue et les différentes phases de la mémoire (Johansen et al. 2011)

Acquisition	Si une drogue administrée avant mais pas après un apprentissage altère la mémoire à court et long terme, elle perturbe l'acquisition
Consolidation	Si une drogue administrée avant ou après un apprentissage n'a pas d'effet sur la mémoire à court terme mais altère la mémoire à long terme, elle perturbe la consolidation
Reconsolidation	Si une drogue administrée après le rappel d'une mémoire consolidée n'a pas d'effet sur la mémoire à très court terme (2-4 h) mais altère la mémoire à plus de 24h, elle perturbe la reconsolidation

2. La neurobiologie du conditionnement de peur au son

a. L'amygdale et la peur

L'amygdale une structure clé de la peur

Dès la fin du XIX^{ème} siècle, Brown et Shäfer (1888, cité dans Maren 2001) et Klüver et Bucy (1937, cité dans Maren 2001) ont décrit des modifications importantes de la réponse émotionnelle de singes dont le lobe temporal avait été retiré. Ces données ont été confirmées chez l'homme au milieu du XX^{ème} siècle avec la description du syndrome de Klüver et Bucy qui comprend, parmi d'autres symptômes, une incapacité à ressentir et exprimer de la peur (Terzian and Ore 1955). Parmi les structures lésées du lobe temporal, plusieurs études ont permis de suspecter fortement l'amygdale dans le trouble de la peur (pour un historique, voir Maren 2001). Le cas de la patiente S.M. est une bonne illustration du lien entre amygdale et peur : S.M. est une patiente examinée dans les années 90 et présentant une lésion bilatérale quasi-exclusive de l'amygdale due à la maladie de Urbach-Wiethe (l'hippocampe et les structures néocorticales adjacentes à l'amygdale ne sont pas affectées). Feinstein et ses collaborateurs publient ainsi une étude dans laquelle ils décrivent tous les moyens qu'ils ont mis en œuvre pour essayer de lui faire peur (Feinstein et al. 2011). Toutefois, S.M. ne présente aucun des signes de peur classiques lorsqu'elle est exposée à un danger (immobilité paralysante, fuite, fébrilité, réponse viscérale,…) mais répond plutôt par une grande excitation et une curiosité caractérisées par beaucoup exploration (Feinstein et al. 2011).

De manière importante, S.M. ne peut pas subir un conditionnement de peur. Ainsi lorsqu'un SC visuel ou auditif est associé plusieurs fois à un son soudain très intense (SI), elle assimile très bien les informations et rapporte verbalement une association entre SC et SI mais ne montre aucun signe de peur lorsque le SC est représenté *a posteriori* (Bechara et al. 1995). En dehors du laboratoire, un nombre important de témoignages de S.M. elle-même et de ses proches montrent qu'elle se retrouve dans des situations dangereuses de manière répétée sans être capable d'apprendre à les éviter. (Feinstein et al. 2011).

L'observation de cette patiente illustre donc le fait que l'amygdale est impliquée à la fois dans la peur inconditionnée, dans le sentiment de peur mais également dans le conditionnement de peur. Des observations similaires ont été faites chez l'animal : les lésions de l'amygdale empêchent à la fois l'expression d'une peur inconditionnée et d'une peur conditionnée. En effet, les rats dont l'amygdale est lésée n'évitent plus ni le prédateur ni l'électrode qui s'approche pour leur délivrer un choc électrique (Blanchard and Blanchard 1972).



Figure 8 : Dessin par Benjamin Baret[7], extrait de « Neurocontes : histoires (de cerveaux) extraordinaires » écrits et contés par Mani Saignavongs et illustrés par Benjamin Baret pour la Semaine du Cerveau éditions 2014 et 2015. (Saignavongs and Baret 2014)

« [Feinstein et ses collaborateurs (2011)] l'ont tout d'abord emmenée dans un magasin vendant des animaux exotiques, et notamment des serpents et des araignées. Alors qu'elle disait détester ces bestioles, elle n'a eu aucune appréhension à manipuler et caresser un serpent pendant trois minutes. Elle a même demandé au vendeur si elle pouvait recommencer avec ses spécimens les plus dangereux, ce qui lui a été refusé, et il a fallu l'arrêter quand elle a voulu toucher une mygale.»[8]

L'amygdale, un rôle clé dans le conditionnement de peur

L'amygdale est une structure paire située dans la partie médiane du lobe temporal des mammifères. Elle est composée de plusieurs noyaux qui s'avèrent très différents quant à leurs caractéristiques morphologiques (taille, forme, densité,…), leurs connexions avec le reste du cerveau, leurs fonctions ainsi que leurs origines embryologiques. Cette hétérogénéité amène certains auteurs à parler de complexe amygdalien plutôt que d'amygdale (Swanson and Petrovich 1998). Parmi les différents noyaux de l'amygdale (voir Figure 9), on distingue en particulier les noyaux basaux-latéraux (que je noterai BLA) qui regroupent les noyaux latéral (LA), basal (B) et les noyaux cortico-médian qui regroupent les noyaux cortical (CoA), basal accessoire (AB), médial (MeA) et central (CeA).

[7] http://benjaminbaret.blogspot.fr/

[8] Pierre Barthélémy, La femme qui ne connaît (presque) pas la peur [en ligne], Passeur de science, Blog Le Monde, 13/02/2013, Disponible sur http://passeurdesciences.blog.lemonde.fr/2013/02/13/la-femme-qui-ne-connait-presque-pas-la-peur/, consulté le 03/0302016

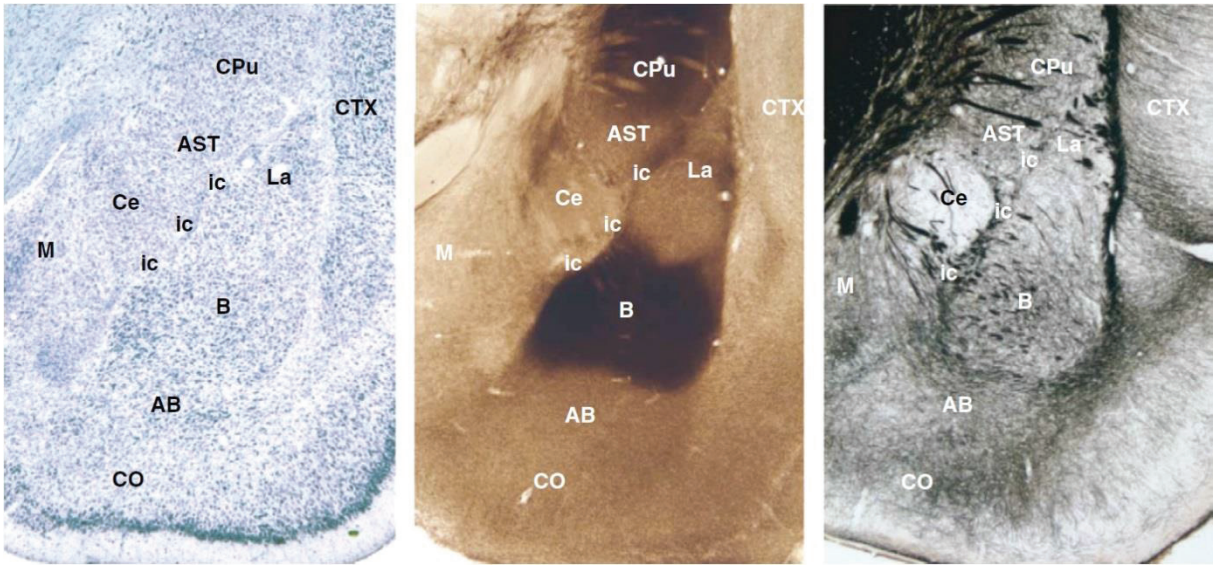


Figure 9 : Organisation du complexe amygdalien. Marquage au Nissl (gauche), à l'acétylcholinestérase (milieu) et à l'argent (droite). Noyaux de l'amygdale : AB, basal accessoire ; B, basal ; Ce, central ; CO, corticale ; ic, cellules intercalées ; La, latéral ; M, médial. Structures non amygdaliennes : AST, transition amygdalo-striatale ; CPu, striatum ; CTX, cortex (LeDoux 2007).

Dans le cadre d'un conditionnement de peur, l'implication de l'amygdale a été largement décrite (pour revue, voir Maren 2001; Davis 1992a; Fanselow and LeDoux 1999; Cahill et al. 2001; Johansen et al. 2011). Des lésions irréversibles ont permis de mettre en évidence le rôle du BLA dans l'acquisition et le rappel du conditionnement de peur (LeDoux et al. 1990; Campeau and Davis 1995; Maren et al. 1996a), et des lésions temporaires ont permis de montrer que cette implication de l'amygdale avait lieu à la fois pendant l'acquisition, la consolidation, le rappel et la reconsolidation de la trace mnésique (Helmstetter and Bellgowan 1994; Muller et al. 1997; Schafe and LeDoux 2000; Goosens and Maren 2001; Nader et al. 2001; Sacchetti et al. 1999; Doyère et al. 2007). La mémoire de l'association SC-SI serait supportée par une plasticité induite par le conditionnement dans l'amygdale. En effet si l'on bloque cette plasticité en injectant un antagoniste des récepteurs au NMDA, on empêche l'apprentissage de l'association (Miserendino et al. 1990; Campeau et al. 1992; Fanselow and Kim 1994; Maren et al. 1996b). Par ailleurs, l'expression de la peur conditionnée implique le CeA. En effet, plusieurs études ont mis en évidence son rôle dans le conditionnement de peur (Nader et al. 2001; Goosens and Maren 2001) et la stimulation du CeA induit un ensemble de comportements de défense classiquement observés lors du conditionnement ou du rappel (Iwata et al. 1987; Kapp et al. 1982). Toutefois, bloquer la plasticité synaptique dans cette structure n'empêche pas le conditionnement de peur (Fanselow and Kim 1994), ce qui pourrait suggérer que le CeA serait impliqué dans l'expression de la mémoire de peur mais pas son stockage.

Dans le cadre d'un conditionnement auditif ou visuel, les informations concernant le SC et le SI convergeraient donc sur le LA qui serait le lieu d'une plasticité synaptique favorisant la réponse ultérieure des neurones de l'amygdale au stimulus conditionné, et l'expression de la peur via le CeA (voir Figure 10).

b. Implication des cortex sensoriels

Ainsi, l'amygdale semble cruciale dans l'acquisition et le maintien des mémoires de peur. Toutefois, elle ne travaille pas seule pour mettre en place le conditionnement de peur à l'odeur. Dans le cadre du conditionnement auditif, il a été montré que deux circuits parallèles étaient mis en jeu, un

circuit court et un circuit long (LeDoux 1996), voir aussi Figure 10. Le circuit court est médié par des projections directes du thalamus sur l'amygdale et permet un traitement très rapide mais grossier du SC. Le circuit long est constitué du thalamus qui envoie l'information dans le cortex sensoriel auditif. Ce cortex affine la discrimination du stimulus et envoie une information plus détaillée à l'amygdale. Ainsi, si le cortex auditif est lésé, le conditionnement de peur peut avoir lieu mais la réponse de peur conditionnée est généralisée à d'autres stimuli auditifs (Jarrell et al. 1987; Armony et al. 1997). Des études récentes ont confirmé que le thalamus et le cortex sensoriel sont nécessaires au rappel d'une mémoire de peur à long terme (Sacco and Sacchetti 2010; Do-Monte et al. 2015). Ce modèle a toutefois été remis en cause par certaines études (Armony et al. 1997), et certains auteurs suggèrent que le cortex sensoriel ne participe qu'à l'analyse de stimuli complexes (pour une discussion, voir Grosso et al. 2015).

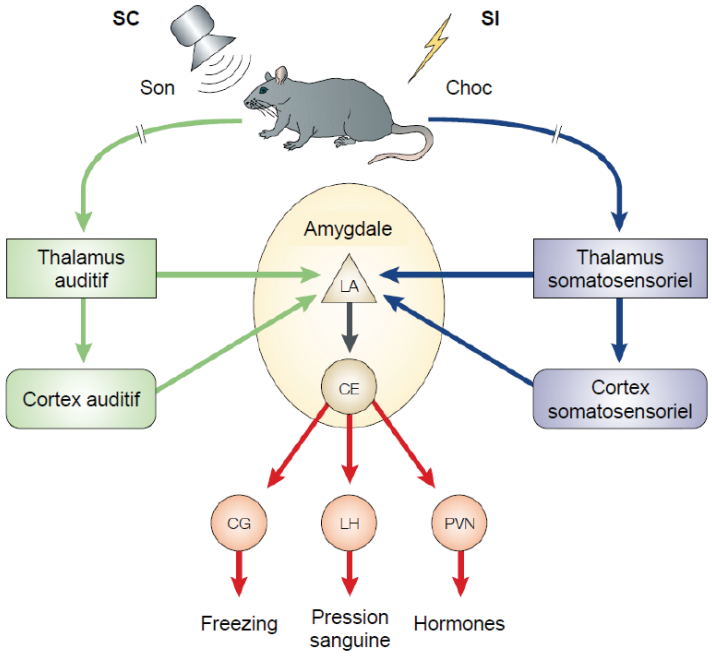


Figure 10 : Les circuits du conditionnement de peur au son. LA, amygdale latérale ; CE, amygdale centrale ; CG, substance grise périaqueducale ; LH, hypothalamus latéral ; PVN, noyau para-ventriculaire du thalamus. Traduit de Medina et al (2002) par Hegoburu (2012).

c. Apprendre le contexte : Rôle de l'hippocampe

Lorsque j'étais petite, un été, alors que j'allais chercher pieds-nus une bouteille d'eau dans le cellier de la maison de mes grands-parents, j'ai marché sur un bout de verre caché dans le tapis à poils en brosse à l'entrée du cellier. Il s'est enfoncé profondément dans ma peau et m'a fait très mal. Suite à cet épisode malheureux, j'ai longtemps eu peur de marcher pieds-nus et avait en horreur la sensation de ce tapis sur la plante de mes pieds. Mais je n'ai pas seulement associé le tapis et la douleur générée par le bout de verre. Je me souviens également que c'était l'été, qu'il faisait chaud et que l'obscurité et la fraicheur du cellier étaient bienvenues dans la canicule. Je me souviens aussi de ma mère et mon oncle qui soignent ensuite mon pied blessé en m'asseyant sur une chaise de la salle à manger. L'ensemble de ces détails constituent un épisode. Dans le cas du conditionnement de peur, c'est le contexte spatio-temporel de la mémoire émotionnelle. Chez l'animal, un nombre important d'études

suggèrent l'existence d'une mémoire pseudo-épisodique qui encoderait un évènement dans son contexte spatio-temporel (Clayton and Dickinson 1998; Ergorul and Eichenbaum 2004; Zhou and Crystal 2010; Fellini and Morellini 2013; Veyrac et al. 2015). Chez le rat, une telle mémoire est dépendante de l'hippocampe (Ergorul and Eichenbaum 2004; Fellini and Morellini 2013; Veyrac et al. 2015).

L'hippocampe est une structure qui reçoit des afférences sensorielles multimodales : il traite des informations spatiales visuelles[9] (Morris et al. 1982), olfactives (Eichenbaum et al. 1987), auditives (Edeline et al. 1988) et tactiles (Pereira et al. 2007). Ces informations multi-sensorielles permettent de représenter un contexte qui peut ensuite être associé au SI. Lorsqu'un rat est mis dans une cage expérimentale et est soumis à un conditionnement de peur au cours duquel un choc ne peut pas être prédit par un stimulus particulier, il montre une réponse de peur à la cage elle-même lorsqu'il y est replacé 24h plus tard (Winocur et al. 1987; Fanselow 1990). Le rat apprend alors à associer le choc à l'ensemble du contexte plutôt qu'à un SC discret. Un tel conditionnement est bloqué si l'hippocampe de l'animal est lésé (Kim and Fanselow 1992; Phillips and LeDoux 1992; Sanders et al. 2003). Grâce à ses afférences multimodales, l'hippocampe permettrait d'assembler l'ensemble des éléments du contexte en une représentation configurale qui pourrait ensuite être associée au choc au sein de l'amygdale (Fanselow 1990; Goosens and Maren 2001).

d. Contrôle de la peur : le cortex préfrontal

Suite à la malheureuse histoire du bout de verre dans le tapis que je vous ai racontée, je me suis peu à peu remise à marcher pieds nus l'été chez mes grands-parents, d'abord en évitant soigneusement le tapis, puis en faisant très attention quand je devais passer dessus et finalement en n'y faisant presque plus attention. Le fait que la réponse conditionnée diminue au cours du temps lorsque le SC est présenté seul de manière répétée s'appelle l'extinction. Il est maintenant admis que, chez l'adulte tout du moins, l'extinction n'est pas une perte de la trace mnésique du conditionnement mais plutôt un nouvel apprentissage. Ce nouvel apprentissage serait sous-tendu par le cortex préfrontal médian (mPFC, Morgan et al. 1993; Quirk et al. 2000; Kim and Richardson 2010). En effet, la lésion du mPFC avant un conditionnement de peur n'affecte pas l'acquisition mais empêche l'extinction (Morgan et al. 1993). Au contraire, la stimulation électrique ou chimique intracérébrale du mPFC inhibe la réponse de peur générée par la stimulation intra-cérébrale de l'amygdale (Al Maskati and Zbrożyna 1989; Quirk et al. 2003) ou par un conditionnement de peur (Milad and Quirk 2002).

Le cortex préfrontal aurait donc un rôle dans le contrôle de la peur. Toutefois, à l'intérieur du mPFC, on peut distinguer des rôles différents pour le cortex prélimbique et le cortex infralimbique. En effet, Quirk et al. (2000) ont montré que le cortex infralimbique était impliqué dans la rétention à long-terme de l'extinction des mémoires de peur. Au contraire du cortex infralimbique, le cortex prélimbique serait impliqué dans l'expression de la peur suite à un apprentissage aversif. En effet, sa lésion dans un conditionnement de peur au son empêche l'expression de la réponse conditionnée (pour revue, voir Milad and Quirk 2012).

Par conséquent, le mPFC a un double rôle dans le contrôle de la peur, les cortex prélimbique et infralimbique se projetant tous les deux sur l'amygdale mais ayant des effets différents sur le conditionnement.

[9] Prix Nobel physiologie ou médecine à John O'Keefe, May-Britt Moser et Edvard Moser en 2014 pour la découverte des cellules de lieu (perception spatiale) dans l'hippocampe

III. Le conditionnement de peur à l'odeur

1. Le rôle de l'amygdale dans la mémorisation de l'association odeur-choc

Comme précisé plus haut, l'amygdale reçoit des afférences directes du bulbe olfactif. Celles-ci se projettent sur le CoA, et la portion rostro-ventrale du MeA (certains auteurs citent également le noyau du tractus olfactif latéral, le cortex périamygdalien et la portion ventrale de l'aire amygdaloïde antérieure comme des noyaux de l'amygdale olfactive, voir Swanson and Petrovich 1998). Ces noyaux amygdaliens reçoivent aussi des projections importantes du cortex piriforme qui se projette également sur d'autres noyaux de l'amygdale : le CeA et le BLA reçoivent ainsi des afférences plus légères du cortex piriforme (McDonald 1998).

La neurobiologie du conditionnement de peur à l'odeur a été moins étudiée que celle du conditionnement auditif, mais les études disponibles ont permis de suggérer qu'il serait médié par des réseaux équivalents. Tout d'abord, des expériences de lésion de l'amygdale ont montré son rôle critique dans l'acquisition, la consolidation et la rétention de l'apprentissage : Cousens et Otto (1998) montrent ainsi que la lésion irréversible du BLA avant l'apprentissage mais également 1 ou 15 jours après l'apprentissage suffisent à empêcher tout comportement de défense lors d'une présentation ultérieure du SC. Ce résultat montre que le BLA est nécessaire au conditionnement de peur à l'odeur. Par ailleurs, Kilpatrick et Cahill (2003) ont montré qu'une inactivation temporaire de l'amygdale en utilisant de la tétrodotoxine[10] juste après le conditionnement de peur à l'odeur diminue la réponse conditionnée à l'odeur mesurée 48h plus tard. Ces résultats permettent de préciser qu'une amygdale fonctionnelle est nécessaire à l'acquistion et à la consolidation de la mémoire de peur à l'odeur.

Un ensemble d'études a montré que l'amygdale était activée dans le conditionnement de peur à l'odeur. Tout d'abord, elle est activée par le conditionnement : l'apprentissage odeur – choc induit une augmentation de l'absorption de 2-DG dans le BLA (Sullivan et al. 2000a; Moriceau and Sullivan 2006; Raineki et al. 2009). De plus, d'autres noyaux amygdalien sont activés par le conditionnement : Regina Sullivan et ses collaborateurs (Moriceau et al. 2006; Raineki et al. 2010b) montrent ainsi que l'amygdale médiale (MeA) et corticale (CoA) sont activées dans le conditionnement de peur à l'odeur en plus du BLA.

Ensuite, un ensemble d'études a montré que le conditionnement de peur à l'odeur induit une plasticité dans l'amygdale. Ainsi, l'expression du gène précoce *c-fos* dans le BLA (qui marque une activité récente des neurones, ou une plasticité, selon les auteurs) est augmentée par le conditionnement (Funk and Amir 2000), tout comme *BDNF*, gène tardif impliqué dans la réorganisation des synapses nécessaires à la plasticité (Jones et al. 2007). De plus, l'association entre l'odeur et le choc modifie les propriétés neurophysiologiques de l'amygdale à l'échelle unitaire (Rosenkranz and Grace 2002; Motanis et al. 2012) et populationnelle (Sevelinges et al. 2004). La réponse de l'amygdale à l'odeur conditionnée est modifiée de manière spécifique et n'est pas généralisée à d'autres odeurs (Rosenkranz and Grace 2002).

Cette implication du BLA dans le conditionnement de peur à l'odeur est subordonnée à l'activité des récepteurs NMDA (Walker et al. 2005). En effet, l'amygdale voit sa concentration de glutamate augmentée de manière transitoire suite à la première association entre l'odeur et le choc (Hegoburu et al. 2009) et la transmission glutamatergique NMDA-dépendante est particulièrement

[10] La tétrodotoxine (ou TTX) est une drogue à action longue qui agit comme la lidocaïne en inhibant la conduction nerveuse via le blocage des canaux sodiques.

importante pour cette première association: lorsqu'un antagoniste des récepteurs NMDA est infusé dans le BLA juste avant la première association, il empêche le conditionnement, mais s'il est infusé juste après, le conditionnement a bien lieu, à un niveau comparable aux contrôles recevant une solution saline (Hegoburu et al. 2014).

Par conséquent, comme dans le conditionnement de peur au son, l'amygdale semble être une structure clé du conditionnement odeur-choc : elle est activée par le conditionnement, sa lésion empêche l'apprentissage et cet apprentissage y induirait une plasticité.

2. L'implication des cortex sensoriels

a. Cortex piriforme antérieur

Dans le cadre du conditionnement de peur à l'odeur, le cortex piriforme antérieur aurait un rôle dans l'analyse fine du stimulus olfactif. Ainsi, l'activité électrophysiologique de type oscillatoire du CPa évoquée par l'odeur conditionnée augmente tout au long du conditionnement (Barnes et al. 2011). En particulier, la puissance de l'activité oscillatoire en réponse à l'odeur conditionnée augmente entre le début et la fin du conditionnement dans un groupe associant une odeur et un choc alors qu'aucune augmentation de ce type n'est constatée chez les rats contrôles (Barnes et al. 2011). Par ailleurs, l'injection d'un agoniste GABA dans le piriforme antérieur 30 min après la session de conditionnement induit la généralisation du conditionnement à d'autres odeurs (Barnes and Wilson 2014). Comme le cortex auditif dans le cas du conditionnement de peur au son, le CPa semble donc nécessaire à l'encodage précis du souvenir olfactif dans le cas du conditionnement de peur à l'odeur (Wilson and Sullivan 2011; Barnes and Wilson 2014).

b. Cortex piriforme postérieur

Si le CPa semble nécessaire à l'encodage fin de l'odeur, il ne montre pas d'augmentation d'activité en 2-désoxyglucose (2-DG, Moriceau et al. 2006; Raineki et al. 2009) lors du conditionnement de peur à l'odeur lui-même, ni de potentialisation à long terme qui suggèrerait un rôle dans le stockage de la trace mnésique (Sevelinges et al. 2004). Le cortex piriforme postérieur, par contre, présente une augmentation d'activité suite au conditionnement de peur à l'odeur (2-DG, Moriceau et al. 2006; Raineki et al. 2009).

Des études de lésion ont permis de suggérer qu'il était impliqué dans le stockage à long terme de la valence aversive acquise de l'odeur : Sacco et Sacchetti (2010) ont réalisé une lésion excitotoxique du CPp de rat ayant subi un conditionnement de peur à l'odeur. Ils ont ainsi montré que le CPp était nécessaire au rappel correct du souvenir aversif à long terme (à 30 jours). Toutefois, le CPp n'est pas nécessaire au rappel d'une mémoire récente ni à l'apprentissage d'une nouvelle association. En effet, s'il est lésé seulement un jour après le conditionnement, ou avant celui-ci, le rat développe une réaction de défense normale à la présentation ultérieure de l'odeur conditionnée.

Cette étude suggère que le CPp est nécessaire à la mémoire à long terme du conditionnement. Cela semble confirmé par le fait que le CPp est le lieu d'une plasticité synaptique liée à l'apprentissage. En effet, suite au conditionnement, le CPp subit une augmentation du BDNF (Jones et al. 2007), facteur impliqué dans la potentialisation à long terme. De plus, Sevelinges et al (2004) ont montré que l'apprentissage de peur à l'odeur induit une facilitation synaptique dans le CPp. Par ailleurs lorsqu'un antagoniste des récepteurs NMDA est injecté dans le cortex piriforme avant un conditionnement de peur à l'odeur, les animaux présentent un déficit de mémoire à long terme de l'apprentissage

(Hegoburu et al. 2014) . Une telle diminution n'est pas visible dans la mémoire récente (24h), suggérant que la plasticité du CPp est bien nécessaire à la mémoire à long terme spécifiquement.

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que la valence négative de l'odeur conditionnée serait donc encodée à long terme directement dans le CPp (Sacco and Sacchetti 2010; Hegoburu et al. 2014). Cet encodage de la signification comportementale du stimulus directement dans le cortex sensoriel concerné permettrait une réponse précoce au stimulus (Li 2014; une vue équivalente dans le système visuel est proposée par Pessoa and Adolphs 2010).

3. L'implication d'autres structures

Une autre structure semble importante pour le conditionnement de peur à l'odeur. Ainsi, l'équipe de Tim Otto a montré que le cortex périrhinal est crucial pour la mémoire de l'odeur : sa lésion conduit à une réponse de peur diminuée lorsque l'odeur conditionnée est présentée seule 24h après le conditionnement (Herzog and Otto 1997). De manière importante, cette lésion n'affecte pas un apprentissage de peur au contexte (Herzog and Otto 1997) ou au son (Sacco and Sacchetti 2010). Le rôle exact du cortex perirhinal reste à élucider : les études réalisées ne permettent pas de conclure s'il est impliqué dans l'association entre l'odeur et le choc, la consolidation de la mémoire ou la rétention de l'apprentissage. Des inactivations temporaires immédiatement après l'association ou avant un rappel à court ou long terme permettraient de préciser ce point.

Enfin, des études ont également permis de montrer que le conditionnement de peur à l'odeur induit une plasticité à des niveaux plus périphériques du système olfactif : l'association entre l'odeur et le choc permet une augmentation spécifique de la réponse des neurorécepteurs à l'odeur conditionnée (Kass et al. 2013), ainsi qu'une augmentation de la taille des glomérules associés (Jones et al. 2008).

En conclusion, le réseau impliqué dans le conditionnement de peur à l'odeur chez le rat adulte présente de nombreuses similarités avec celui mis en jeu dans le conditionnement de peur au son : si l'amygdale joue un rôle clé dans la formation de l'association, le cortex olfactif semble quant à lui impliqué dans le stockage à long terme de la valence acquise de l'odeur.

Chapitre 3

Ontogenèse du conditionnement de peur à l'odeur

I. Le modèle raton

1. Le développement moteur et sensoriel du raton

Les premiers écrits sur le développement du rat domestique sont probablement ceux de Willard S. Small (1899). Il y décrit les caractéristiques physiques, sensorielles et motrices de rats de la naissance à la fin de la 4ème semaine. Il divise également les premières semaines de vie du rat en plusieurs périodes : la prime enfance (*infancy*) et l'enfance véritable (*childhood*, d'autres auteurs y réfèrent en utilisant le terme de juvéniles, *juvenile age*). Suite à ces périodes, le rat passe par une phase adolescente qui correspond à la puberté, puis devient adulte. La prime enfance reflète alors la période allant de la naissance à la fin de la maturation des systèmes neuro-musculaires et sensoriels, peu avant le sevrage. Dans cet article, Small montre bien, malgré une méthode scientifique un peu balbutiante, que le rat est un animal dont le développement sensori-moteur est très immature à la naissance. On parle d'espèce nidicole : le petit naît à un stage développemental immature et est dépendant d'un parent pour survivre à la naissance. Or, pour mieux comprendre le comportement et les capacités d'un organisme, il est important de comprendre quelles informations il reçoit du monde qui l'entoure. Les modifications du monde perceptif du rat au cours de son développement ont été élégamment décrites dans une revue par Jeffrey Alberts (1984).

Chez toutes les espèces, les capacités sensorielles semblent émerger dans un ordre précis et très conservé dans la phylogénie : le toucher émerge avant le système vestibulaire, puis l'audition et enfin la vision (Alberts 1984). A l'époque de cette revue, la maturation des systèmes olfactif et gustatif n'avait pas été étudiée dans suffisamment d'espèces pour pouvoir permettre des hypothèses quant à la conservation phylogénétique de leur développement. Il est toutefois intéressant de remarquer que selon les espèces, la naissance peut avoir lieu à des moments différents de la maturation de la perception (voir Figure 11). Chez le rat en particulier, bien que l'âge des premières perceptions par les sens chimiques soit difficile à évaluer, ces sens sont tous utilisables à la naissance. Ils ne présentent toutefois pas toutes les caractéristiques qui sont observées chez l'adulte et subissent une maturation fonctionnelle au début de la vie post-natale. L'olfaction par exemple est cruciale pour la survie du raton dès la naissance : ce sont des stimuli olfactifs qui guident le raton vers la mamelle maternelle (Hofer et al. 1976) et un jeune anosmique est incapable de trouver la mamelle et de s'y attacher (Singh and Tobach 1975). Toutefois, entre la naissance et le 30ème jour le volume du bulbe olfactif est multiplié par 7 (Rosselli-Austin and Altman 1979; Alberts 2012), il acquiert la majorité de ses interneurones inhibiteurs de la couche granulaire (Rosselli-Austin and Altman 1979; Mair et al. 1982), les afférences vers le bulbe se développent, comme les afférences noradrenergiques (McLean and Shipley 1991), et ses propriétés neurophysiologiques sont modifiées (Salas et al. 1969; Mair and Gesteland 1982; Fletcher et al. 2005). Plus en aval, le cortex piriforme et le tractus olfactif latéral entre le bulbe et le CP subissent également des maturations fonctionnelles, souvent modulées par l'expérience sensorielle (Schwob et al. 1984; Best and Wilson 2003; Franks and Isaacson 2005).

L'audition et la vision apparaissent plus tard. On considère classiquement que ces fonctions apparaissent à l'ouverture respective du conduit auditif (vers 12-13 jours postnataux – PN12-13) et des paupières (vers PN13-14). A ces âges, la réponse du raton à des stimuli auditifs et visuels est très nettement augmentée. Toutefois, il est important de préciser que les récepteurs sensoriels et les systèmes sensoriels correspondants sont mis en place avant l'ouverture des appendices sensoriels et que le fonctionnement des systèmes sensoriels mature après ouverture (pour discussion, voir Alberts 1984; pour une description plus détaillée des différents événements de maturation chez le rat et d'autres espèces, voir Clancy et al. 2001).

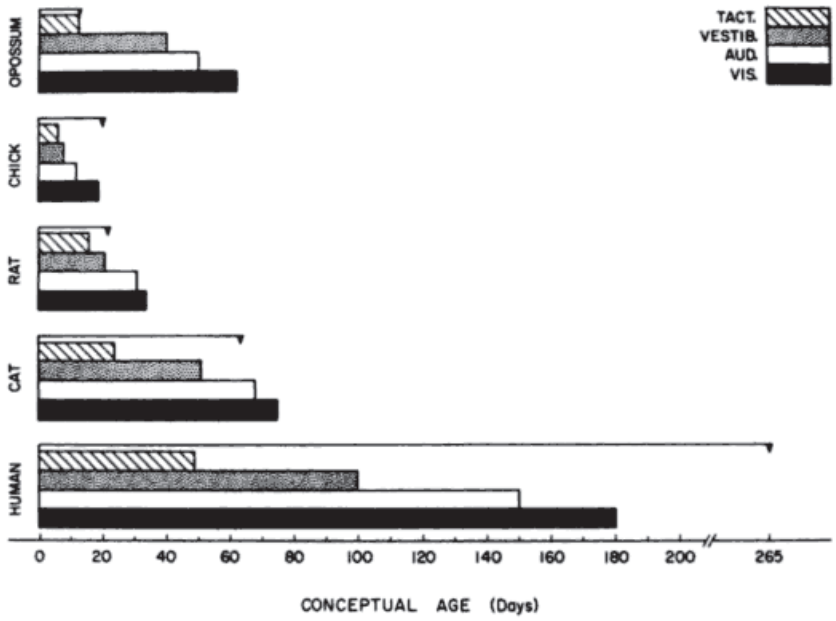


Figure 11 : Ages successifs auxquelles les premières informations sensorielles tactiles, vestibulaires, auditives et visuelles sont perçues par l'organisme au cours du développement chez l'opossum (un marsupial, Didelphis viginiana), un oiseau (Gallus gallus), un rongeur (Rattus norgevicus), un carnivore (Felis catus) et l'homme, un primate. La flèche indique l'âge de naissance par rapport à la date de conception (Alberts 1984).

La locomotion mature également après la naissance du raton et son développement a été décrit par plusieurs auteurs comme Small (Small 1899), Bolles et Wood (1964), Altman et Sudarchan (1975). A la naissance, le raton se déplace très peu, il peut se retourner lorsqu'il est sur le dos, lève sa tête pour trouver la mamelle maternelle. Le déplacement commence par des mouvements chaotiques des membres supérieurs et inférieurs, entraînant d'abord un déplacement en rampant puis un mouvement de pivot, lorsque la coordination des membres supérieurs augmente. Cette coordination permet également l'apparition des premiers mouvements primitifs du toilettage. La marche apparaît vers PN9-10, permet les premières sorties autonomes du nid et se raffine rapidement pour permettre un déplacement sur un sol inégal. Avec l'apparition de l'audition et de la vision, les ratons deviennent de plus en plus actifs et commencent à sauter, courir, explorent leur environnement, et ils commencent à jouer dès le 15ème jour de vie.

Du fait de l'immaturité sensorielle et motrice du raton, les paradigmes d'étude des capacités cognitives chez l'adulte peuvent rarement être directement transposés au raton. Toutefois, lorsque les limitations physiques sont connues et considérées, il est souvent possible d'adapter les études au raton. Par exemple, un conditionnement opérant permet d'étudier la mémoire, la motivation, le système de récompense,… Les conditionnements opérants chez le rat adulte utilisent généralement des fonctions motrices et de coordination fine qui ne sont pas présentes chez le raton. Toutefois, Johanson et Hall (1979) ont montré que des ratons pouvaient réaliser un conditionnement opérant dès le premier jour de vie si les conditions expérimentales étaient adaptées à leurs capacités motrices et sensorielles (voir un exemple d'une telle adaptation Figure 12).

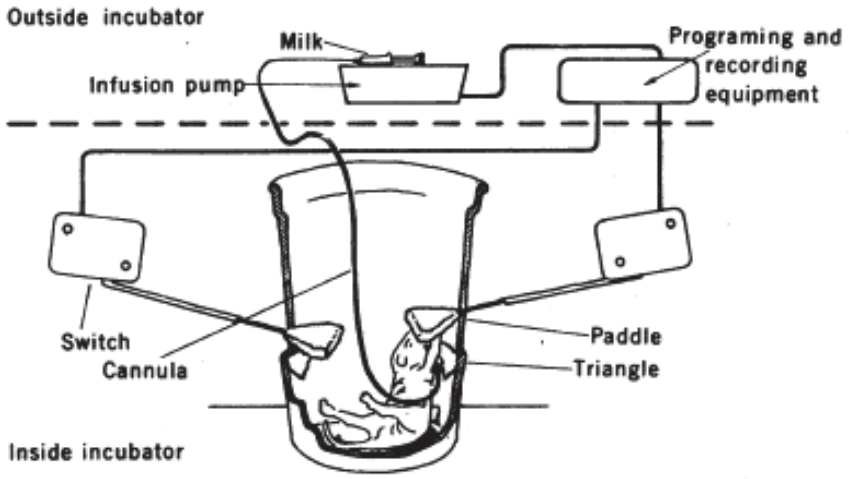


Figure 12 : Exemple d'adaptation d'une tâche de conditionnement opérant pour qu'elle puisse être réalisée par un raton de 1 jour. Le raton peut choisir entre deux leviers, l'un récompensé par du lait, l'autre non récompensé (Johanson and Hall 1979).

2. Le développement neuronal du raton

Comme mentionné rapidement dans le cas du bulbe olfactif, à l'immaturité sensorielle et motrice est corrélée une immaturité du système nerveux. Outre son volume cérébral nettement inférieur à celui d'un adulte, le cerveau du raton en lui-même continue de se développer au cours des premières semaines de vie. Structurellement, tout d'abord, les structures s'individualisent. Les différents noyaux de l'amygdale par exemple se subdivisent entre PN7 et PN14 (Berdel et al. 1997). Certains types cellulaires se développent aussi après d'autres. Dans le cas du bulbe olfactif par exemple, les cellules mitrales sont mises en place durant l'embryogenèse alors que les cellules granulaires sont intégrées au bulbe à 89% après la naissance (Rosselli-Austin and Altman 1979).

La communication intra et inter structures est également largement modifiée, notamment grâce à des changements morphologiques importantes (exemple Figure 13) : la myélinisation des fibres est largement augmentée après la naissance (Davison and Dobbing 1966; Chareyron et al. 2012), tout comme les axones et dendrites de nombreux neurones continuent de s'allonger et/ou de se ramifier (Ryan et al. 2014). Les afférences spécifiques de certains neurotransmetteurs se raffinent (noradrénaline dans le bulbe McLean and Shipley 1991; dopamine dans le striatum Antonopoulos et al. 2002; GABA dans l'amygdale Ehrlich et al. 2013). A un niveau plus fin, les synapses se développent progressivement. Par exemple, à PN4, seules 1% des synapses du gyrus denté adulte sont présentes (Crain et al. 1973) et seulement 6% des synapses du BLA (Ryan et al. 2014).

Les propriétés neurophysiologiques des neurones (potentiels de membranes, excitabilité,…) sont largement modifiées au cours de l'ontogenèse dans de nombreuses structures (amygdale : Ehrlich et al. 2012; locus coeruleus : Nakamura et al. 1987; striatum : Tepper et al. 1998), tout comme les activités oscillatoires des populations qu'ils forment (bulbe olfactif : Salas et al. 1969; Fletcher et al. 2005).

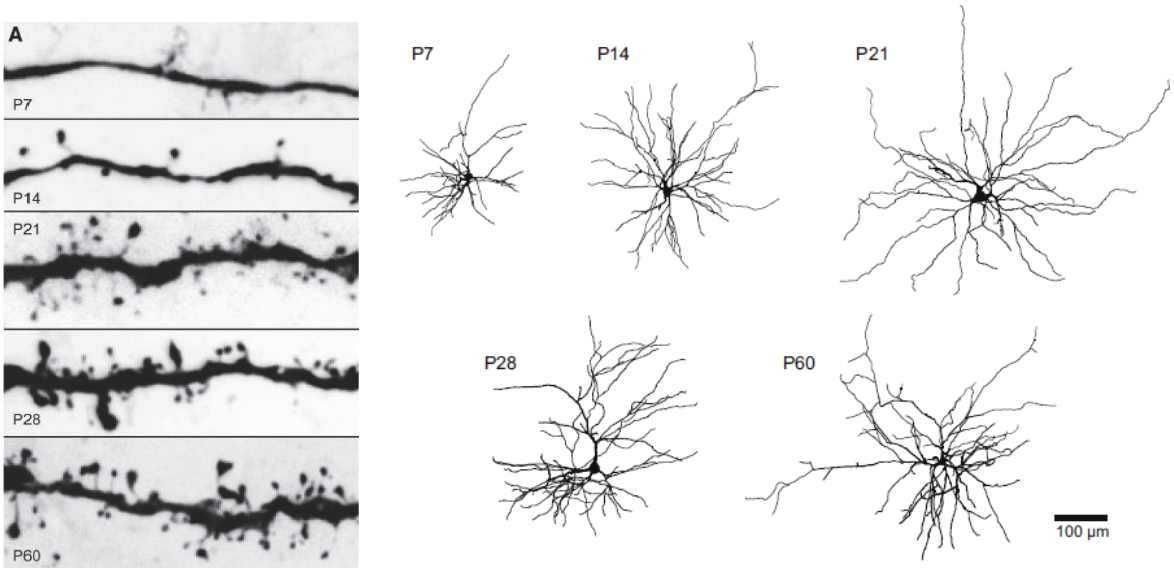


Figure 13 : Maturation des neurones au cours de l'ontogenèse. A. Augmentation du nombre de boutons synaptiques au cours du développement de neurones du BLA marqués à la biocytine. B. Croissance du soma et des dendrites de ces mêmes neurones (Adapté de Ryan et al. 2014).

Enfin, ces modifications neuroanatomiques et neurophysiologiques ont des conséquences sur le fonctionnement des structures cérébrales. Ainsi, certaines fonctions cognitives semblent ne pas être présentes avant un certain âge chez le rat. Les fonctions cognitives impliquant l'hippocampe par exemple (apprentissage spatial et configural) n'apparaitraient qu'aux alentours du sevrage (PN21-23; Rudy 1993, 1994; Rudy and Morledge 1994; Rudy et al. 1987; Ivkovich et al. 2000; Raineki et al. 2010a). Le cortex frontal subit également d'importantes modifications entre PN1 et PN18 (van Eden and Uylings 1985; Verwer et al. 1996) et, de manière corrélée, certaines des fonctions cognitives associées à cette structure chez l'adulte, telle que l'extinction de l'expression de mémoires de peur, ne semblent pas fonctionnelles chez le raton (Nair et al. 2001; Kim and Richardson 2010).

Le raton présente donc un système nerveux unique, avec un fonctionnement des différentes structures cérébrales particulier à certains âges, ce qui en fait un modèle intéressant pour étudier la neurobiologie des fonctions cognitives.

3. L'intérêt du modèle raton

Le modèle du raton est bien entendu intéressant en lui-même pour comprendre des mécanismes spécifiques aux différents stades de vie dont par exemple l'attachement dans la prime enfance, l'amnésie infantile, la modulation de la mémoire par la mère, l'atténuation de l'extinction de l'apprentissage pendant l'adolescence,… pour ne mentionner que des phénomènes liés à la mémoire. L'étude d'un modèle animal de ces apprentissages à un âge adapté permet de faire des hypothèses sur les mécanismes neuronaux qui les sous-tendent et de les tester. Des homologies fortes existant entre les systèmes nerveux des mammifères, cette recherche animale permet d'explorer les mécanismes neurobiologiques de la mémoire chez l'homme (avec des précautions toutefois lors de la transposition d'une espèce à l'autre). La compréhension de ces mécanismes permet également de comprendre les causes possibles de pathologies et suggérer des pistes de traitements. Par exemple, Liberman et collègues (2006) ont montré que les enfants et jeunes adolescents ont des capacités d'extinction des apprentissages aversifs diminuées et il a été suggéré que ce fait pourrait être la cause du pic de trouble anxieux observé à l'adolescence. Des études chez l'animal ont montré que cette diminution de l'extinction pourrait être liée à une faible plasticité synaptique du cortex préfrontal

(Pattwell et al. 2012). Cette meilleure compréhension des circuits neuronaux contrôlant les apprentissages émotionnels à l'adolescence pourraient permettre un raffinement des traitements du trouble anxieux à cet âge. Les neuropathologies peuvent également être dues à des traumatismes à un stade précoce. Ainsi, par exemple, des études ont montré que des maltraitances dans la prime enfance pouvaient conduire à des troubles de l'anxiété, des troubles de l'humeur et de la dépression (Heim and Nemeroff 1999; McEwen 2003). Des modèles animaux ont pu modéliser ces effets à long terme d'un stress précoce (Sevelinges et al. 2007, 2008; Raineki et al. 2012) et permettront peut-être à terme d'identifier des traitements et périodes critiques d'intervention pour prévenir ces effets.

Mais l'étude d'un animal à différents stades de son développement présente un autre avantage : j'ai décrit plus haut que le système nerveux du raton subissait un développement considérable au cours des premières semaines de sa vie. Ce développement permet l'intégration de nouvelles structures cérébrales dans un système qui fonctionnait auparavant sans. Certains auteurs ont suggéré que le raton constitue alors un « modèle unique pour tester des hypothèse dérivées des études de lésion » chez l'adulte (Richardson and Hunt 2009; Fanselow and Rudy 1998). Si la notion de « lésion » est peut-être un peu exagérée puisque c'est l'ensemble du cerveau qui est immature plutôt qu'une structure isolée, il peut être intéressant de chercher à corréler la maturation des structures cérébrales avec la maturation des fonctions cognitives que l'on pense associées. C'est la démarche qui a motivé la première étude de cette thèse, présentée au chapitre 6.

II. Le conditionnement associatif olfactif chez le raton

1. Petite introduction à l'attachement

> *« Le désir de chaleur et de nourriture semble être leur toute première expérience psychique »*[11]
>
> *Small (1899)*

A la naissance, les jeunes des espèces nidicoles sont très démunis et complètement dépendants du parent pour apporter nourriture et soins. Leurs premiers comportements, ainsi que le décrit Small (1899), semblent avoir pour but de rechercher cette nourriture et ces soins, d'approcher la mère ou de l'appeler. Cet apprentissage d'approche au cours d'une période sensible est très conservé au cours de l'évolution. Les premières études ont caractérisé l'empreinte filiale chez les oiseaux : à l'éclosion, les oisillons apprennent à suivre le premier objet en mouvement qu'ils aperçoivent[12,13].

[11] "The desire for warmth and the desire for food seem to be their very first psychic experiences in life"

[12] Prix Nobel de physiologie ou médecine de 1973 à Konrad Lorenz, partagé avec Nikolaas Tinbergen et Karl von Frisch pour leurs découvertes concernant l'organisation et la mise en œuvre de pattern comportementaux individuels et sociaux

[13] Ce phénomène a été popularisée par le film *L'Envolée Sauvage* de Carroll Ballard en 1996, voir Figure 14.



Figure 14 : Affiche de l'Envolée Sauvage, Copyright © 1996 by Colombia Pictures.

Pendant cette période, aussi appelée période sensible pour l'attachement, les oisillons développent une réponse d'approche à tous les types de stimuli, y compris ceux qui ont été associés à un stimulus nociceptif. En effet, le comportement d'approche peut être généré de façon paradoxale par le fait d'associer un objet à un choc électrique (James and Binks 1963; Kovach and Hess 1963; Pitz and Ross 1961). Un phénomène équivalent a été montré dans d'autres espèces nidicoles comme chez le primate (McCormack et al. 2006; Seay et al. 1964; Suomi 1978; Sanchez 2006), le chien (Fisher, 1955, cité dans Rajecki et al. 1978) ou le rat (Camp and Rudy 1988; Sullivan et al. 2000a). Pendant la période sensible pour l'attachement, les jeunes présentent la particularité d'être très peu sensibles au stress : on appelle cette période la période d'hypo-réponse au stress. Elle est caractérisée par des niveaux de glucocorticoïdes plasmatiques faibles et le fait que les stimuli nociceptifs n'évoquent qu'une réponse réduite de l'axe corticotrope (pour revue, voir Lupien et al. 2009).

La réponse d'approche paradoxale suite à un conditionnement associatif nociceptif peut être interprétée en termes évolutifs : avant un certain âge, le jeune d'une espèce nidicole est complètement dépendant de ses parents et doit chercher à se rapprocher d'eux pour pouvoir survivre, et ce quelle que soit la qualité des soins prodigués (Sullivan et al. 2000a). En effet, les comportements parentaux abusifs sont retrouvés dans de nombreuses espèces (pour revues, voir Callaghan et al. 2014; Callaghan and Tottenham 2016) et un attachement à une figure parentale abusive est également observable au cours de la prime enfance chez l'homme (Bowlby 1969; Morton and Browne 1998; Helfer et al. 1999; Perry 2007). La capacité du jeune d'approcher son parent malgré ces maltraitances aurait donc un caractère évolutif important.

2. Le conditionnement associatif olfactif chez le raton au cours de la période sensible pour l'attachement

L'olfaction est extrêmement importante chez les mammifères pour l'interaction mère-jeune, du point de vue de la mère (Corona and Lévy 2015; Lévy and Keller 2009), et du point de vue du jeune : dès la naissance le nouveau-né est capable de reconnaitre l'odeur de sa mère et d'approcher cette odeur pour recevoir chaleur, nutrition et soin nécessaires à sa survie et son développement. Cet apprentissage olfactif associatif commence *in utero* (Pedersen and Blass 1982; Mennella et al. 2001; Schaal et al. 1998) et continue dans la prime enfance (Pattwell et al. 2013; Coureaud et al. 2006; Callaghan et al. 2014; Perry and Sullivan 2014; Rincón-Cortés and Sullivan 2014). Cet apprentissage olfactif fait partie de l'attachement du petit à sa mère et participe à un développement social et émotionnel normal.

Chez le rat, la période sensible pour l'attachement est comprise entre la naissance et le 10ème jour de vie. Au cours de cette période, un conditionnement associant une odeur et un choc conduit les ratons à approcher l'odeur lorsqu'elle est ensuite présentée ensuite seule (Camp and Rudy 1988; Sullivan et al. 2000a). Ce comportement d'approche est très similaire à celui observé lorsque l'odeur est associée à un stimulus récompensant comme du lait, la possibilité de téter, des caresses à l'aide d'un pinceau pour imiter les soins maternels et ces soins maternels eux-mêmes (Alberts and May 1984; Brake 1981; Sullivan and Leon 1986; Weldon et al. 1991; Raineki et al. 2010b; Roth et al. 2013). Cet apprentissage paradoxal n'est pas dû à une insensibilité des ratons au stimulus nociceptif : en effet l'administration du choc entraîne des vocalisations et des comportements de fuite de la part du raton

(Anderson and Patrick 1934; Emerich et al. 1985; Fitzgerald and Gibson 1984; Sevelinges et al. 2011; Small 1899; Stehouwer and Campbell 1978; Sullivan et al. 2000a) et les circuits nociceptifs sont fonctionnels chez le raton (pour des revues sur l'ontogénie de la perception de la douleur, voir Barr 1995; Fitzgerald 2005).

Toutefois, les ratons peuvent apprendre à éviter une odeur à condition qu'elle soit associée à un stimulus aversif intéroceptif dès les derniers jours embryonnaires : une odeur associée à l'injection de LiCl ou un choc d'une intensité suffisante pour induire un malaise gastrique sera évitée par le raton dans un test de choix entre 2 odeurs (Haroutunian and Campbell 1979; Kucharski and Spear 1984; Smotherman 1982; Raineki et al. 2009). Le raton est donc capable d'apprendre à éviter une odeur associée à un stimulus aversif intéroceptif à un âge auquel il montre un comportement d'approche pour une odeur associée à un stimulus aversif extéroceptif.

Ce comportement d'approche paradoxale de l'odeur conditionnée à un stimulus extéroceptif peut être interprété comme résultant d'un phénomène d'attachement à l'odeur : l'odeur conditionnée deviendrait une nouvelle odeur maternelle. En effet, elle acquiert la possibilité de contrôler les comportements pro-sociaux du raton vis-à-vis de sa mère : les chercheurs ont anesthésié une mère ratte allaitante (l'anesthésie empêche la montée de lait) et ont lavé son ventre de toute odeur en utilisant successivement acétone, alcool et eau. Un tel nettoyage permet de retirer toute odeur naturelle des mamelles de la mère et lorsqu'une mamelle ainsi lavée est présentée au raton, il n'est pas capable de s'y attacher et *a fortiori* de commencer à téter. Toutefois, si l'on présente à proximité de la mamelle l'odeur conditionnée par association avec un choc, le raton récupère sa capacité à trouver la mamelle et commencer à téter (Raineki et al. 2010b; Rincón-Cortés et al. 2015), comme le permettrait l'odeur maternelle (Hofer et al. 1976; Teicher and Blass 1977) ou une odeur associée à des caresses (Pedersen et al. 1982; Raineki et al. 2010b). L'odeur conditionnée présente donc bien des caractéristiques de stimulus supportant l'attachement.

3. La neurobiologie du conditionnement de préférence olfactive du raton

Nous avons vu que les apprentissages olfactifs utilisant un US positif (caresses) ou négatif (choc de 0,5 mA) conduisaient à un même comportement d'approche du raton. Plusieurs études suggèrent que les deux associations sont permises par un même circuit neuronal responsable de l'attachement (Raineki et al. 2010b; Roth et al. 2013). J'ai rassemblé ici les données obtenues pour obtenir une image plus globale du conditionnement associatif conduisant à une réponse de préférence pour l'odeur conditionnée chez le raton au cours de la période sensible.

a. Le bulbe olfactif

Comme précisé plus haut, le cerveau du raton n'est pas identique à celui de l'adulte et mature progressivement au cours du développement. La réponse de préférence observée suite à un conditionnement odeur-choc chez le raton de moins de 10 jours est contrôlée par un réseau neuronal nettement différent de celui utilisé chez l'adulte : alors que, comme nous l'avons vu au chapitre 2, la mémoire de l'association SC-SI met en jeu un réseau distribué incluant l'amygdale et le cortex piriforme postérieur à l'âge adulte, chez le raton elle ne requiert pas l'amygdale : celle-ci ne montre aucune activation par marquage au 2-DG (Sullivan et al. 2000a; Moriceau et al. 2006; Raineki et al. 2009; Moriceau et al. 2009) ou au c-fos (Moriceau et al. 2004; Raineki et al. 2010b).

Le bulbe olfactif par contre semble impliqué dans l'apprentissage olfactif chez le raton : tout d'abord, les glomérules impliqués dans le codage de l'odeur conditionnée montrent une augmentation

de l'absorption de 2-DG (Sullivan and Leon 1986; Sullivan and Wilson 1991; Raineki et al. 2009; Moriceau et al. 2009) et du taux de protéines c-fos dans ces mêmes glomérules (Johnson et al. 1995; Raineki et al. 2010b), ainsi qu'une augmentation de pCREB (McLean et al. 1999; Yuan et al. 2000). L'afflux sanguin dans le bulbe est également modifié de manière spécifique par l'odeur conditionnée (imagerie optique des vaisseaux sanguins chez le raton anesthésié, Yuan et al. 2002). Des modifications morphologiques des glomérules sont également observées (Woo et al. 1987), associées à des modifications de la réponse des cellules mitrales (Wilson et al. 1985, 1987; Wilson and Sullivan 1992). Le bulbe olfactif semble donc subir une plasticité suite au conditionnement qui pourrait supporter la mémoire associative olfactive chez le raton.

b. Le rôle de la noradrénaline

Les modifications observées dans le bulbe olfactif sont permises par l'action de la noradrénaline (NA) du locus coeruleus (LC). Le LC est un noyau du tronc cérébral responsable de la synthèse de toute la NA présente dans le système nerveux central (Sara 2009). Dans le bulbe olfactif, les afférences noradrénergiques font synapse principalement au niveau des couches péri-glomérulaires et granulaire (Shipley et al. 1985; McLean and Shipley 1991). Ces projections sont présentes et fonctionnelles dès la naissance du raton (McLean and Shipley 1991) et contrôlent l'excitabilité du bulbe (Wilson and Leon 1988).

Le LC présente un fonctionnement particulier dans les premiers jours de vie du raton (voir Figure 15) : lorsque le raton reçoit une stimulation, son LC libère des niveaux élevés de NA. Ceux-ci sont associés à une réponse unitaire soutenue (20-30 s). Au contraire, les réponses chez l'adulte sont beaucoup plus courtes, elles se mesurent en ms (Nakamura et al. 1987; pour revue sur le développement du LC, voir Nakamura and Sakaguchi 1990). Ces différences seraient dues au fonctionnement particulier des autorécepteurs noradrénergiques du LC dans la période post-natale : chez le raton, les autorécepteurs inhibiteurs $\alpha 2$ ne sont pas fonctionnels jusqu'à la fin de la période sensible alors que les autorécepteurs excitateurs $\alpha 1$ fonctionnent de manière soutenue (Nakamura and Sakaguchi 1990). Cette hypothèse est confirmée par le fait qu'une réactivité du LC identique à celle observée pendant la période sensible peut être rétablie après la fin de la période sensible (à PN15) par l'injection dans le LC d'un mélange d'antagonistes $\alpha 2$ et d'agonistes $\alpha 1$ (Moriceau and Sullivan 2004b). A la fin de la période sensible, le fonctionnement des autorécepteurs du LC devient plus proche d'un fonctionnement adulte (Nakamura and Sakaguchi 1990), et la NA acquiert un rôle de modulation de l'apprentissage (Roozendaal et al. 1999; Harris and Fitzgerald 1991; Liang 1998; Moffat et al. 1993; Sara et al. 1995; Selden et al. 1990; Quirarte et al. 1997; pour revue, voir Sara 2009) plutôt qu'un rôle d'acteur principal tel qu'observé chez le raton.

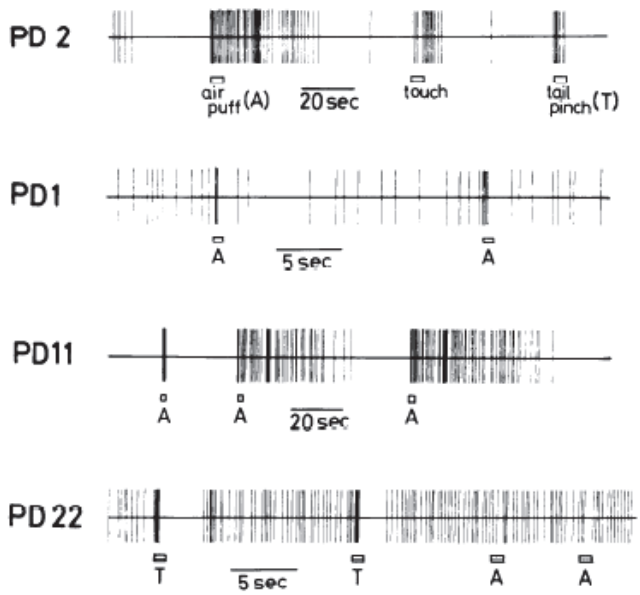


Figure 15 : Réponses du LC à des stimulations somatosensorielles au cours du développement. On note la différence frappante d'activité spontanée entre un raton de 1 jours et de 22 jours (Nakamura et al. 1987). Air puff (A) : bouffée d'air ; Tail pinch (T) : pincement de la queue.

La NA est donc libérée en grande quantité lorsque le SI est présenté (Rangel and Leon 1995) et le conditionnement olfactif diminue lorsque les niveaux de NA diminuent dans le bulbe (Rangel and Leon 1995). Ces afférences noradrénergiques sont nécessaires et suffisantes pour induire une préférence pour l'odeur conditionnée chez le raton : l'infusion dans le bulbe d'un antagoniste des récepteurs noradrénergiques (propranolol, timolol ou yohimbine) avant le conditionnement olfactif empêche la réponse d'approche du raton lorsque l'odeur lui est représentée 24h plus tard, tout comme elle empêche l'augmentation d'absorption de 2-DG et la modification de la réponse des cellules mitrales suite au conditionnement (Sullivan et al. 1989, 1991, 1992; Shakhawat et al. 2012). Au contraire, l'injection d'un agoniste des récepteurs noradrénergiques (isoproterenol) associée à une odeur est suffisante pour créer une préférence pour cette odeur et induire les modifications intrabulbaires associées (Sullivan et al. 1989, 1991; Yuan et al. 2003). La stimulation pharmacologique du LC (idazoxan ou acetylcholine) associée à la présentation d'une odeur produit également une préférence pour cette odeur (Sullivan et al. 2000b), tout comme la stimulation électrique des fibres noradrénergiques (Wilson and Sullivan 1990), alors que sa lésion empêche le conditionnement olfactif (Sullivan et al. 1994). Le système noradrénergique est donc crucial dans le conditionnement olfactif chez le raton.

c. Le cortex piriforme

Lorsqu'une odeur est associée à un SI chez le raton au cours de la période sensible, le cortex piriforme antérieur montre une augmentation d'activité (en 2-DG). Cette activation est également associée à une augmentation de la synthèse de c-fos (Roth and Sullivan 2005) et une potentialisation à long terme des afférences du bulbe olfactif vers le CPa (Morrison et al. 2013). Pour confirmer le rôle du cortex piriforme dans la mémoire associative olfactive chez le raton, Morrison et al (2013) ont inactivé le CPa avec de la lidocaine (un anesthésique local inhibiteur des canaux sodiques) ou du muscimol (un agoniste GABAergique qui favorise l'inhibition par les interneurones GABAergiques de la structure) au cours d'une association olfacto-tactile. Inhiber ainsi le CPa ou bloquer sa plasticité empêche l'expression d'une préférence conditionnée pour une odeur préalablement associée à des caresses. Un résultat similaire est obtenu en inactivant le CPa juste avant le test, suggérant que le CPa

serait impliqué à la fois dans l'acquisition et le rappel du conditionnement. Enfin, comme dans le bulbe, la transmission noradrénergique dans le CPa est nécessaire et suffisante au conditionnement associatif (Morrison et al. 2013).

Le CPa serait donc impliqué dans le conditionnement de préférence olfactive. Notons toutefois que lorsque le raton apprend une aversion pendant la période sensible (dans le cas d'un SI intéroceptif comme mentionné plus haut), le cortex piriforme postérieur montre une augmentation d'activité mais pas le piriforme antérieur (2-DG Raineki et al. 2009).

Par conséquent, le conditionnement olfactif conduisant à une approche de l'odeur conditionnée est permis par un réseau neuronal (bulbe olfactif, LC et CPa) spécifique et un fonctionnement de ces structures unique pour la période sensible pour l'attachement.

4. Après la période sensible, acquisition du conditionnement de peur à l'odeur

Lorsque le jeune commence à gagner en indépendance et à sortir du nid, ce comportement d'approche des stimuli douloureux devient par contre inadapté. A l'âge où le raton commence à marcher (vers PN9-11, Bolles and Woods 1964), la réponse à un conditionnement odeur-choc change pour un comportement d'évitement plus classique comme observé chez l'adulte (Sullivan et al. 2000a; Camp and Rudy 1988; Sullivan and Wilson 1995). Comme ce qui est observé chez l'adulte, cet apprentissage est alors dépendant de l'amygdale : des études ont montré qu'elle était activée par le conditionnement (Sullivan et al. 2000a; Moriceau and Sullivan 2006; Moriceau et al. 2006; Raineki et al. 2009) et son inactivation empêche l'association odeur-choc, (Moriceau and Sullivan 2006). Des modifications au sein du cortex piriforme ont également lieu : le CPa cesse d'être activé par le conditionnement et le CPp est recruté (Moriceau et al. 2006; Raineki et al. 2009; Roth et al. 2006), reproduisant ainsi ce qui est observé chez l'animal adulte.

Le conditionnement odeur-choc génère donc des réponses radicalement opposées pendant et après la période sensible, et les réseaux neuronaux qui sous-tendent l'apprentissage sont très différents.

5. La transition d'un conditionnement appétitif à aversif et l'implication de l'amygdale

a. Le rôle de la corticostérone

La transition entre une réponse de préférence et une réponse d'évitement se fait rapidement : un raton de 8-9 jours apprend à approcher l'odeur alors que le raton de 11-12 jours l'évite (Sullivan et al. 2000a).

Les premières hypothèses pour expliquer cette transition brutale ont suggéré qu'elle serait due à une maturation tardive de l'amygdale (Sullivan et al. 2000a). En effet, le nombre final de neurones n'est atteint qu'à PN14 (Berdel et al. 1997), les subdivisions en noyaux distincts apparaissent à PN7 et se stabilisent autour de PN14 (Berdel et al. 1997), les connexions synaptiques apparaissent vers PN5 et sont optimisées entre PN10 et PN20 (Mizukawa et al. 1989; Ryan et al. 2014) et l'amygdale est encore largement remodelées à l'adolescence, le nombre de neurones diminuant et la complexité des dendrites augmentant (Koss et al. 2014). L'amygdale est donc particulièrement immature avant PN10. Toutefois, la transition d'une réponse de préférence à une aversion est très rapide et la manipulation de certains paramètres pendant la période sensible, tels que l'inactivation du système opioïde, ou des conditions adverses au cours des premiers jours de vie (voir ci-dessous), permet

d'activer l'amygdale et d'induire une aversion à l'odeur chez le raton. Le passage d'un circuit neuronal pour le conditionnement infantile à un circuit adulte n'est donc vraisemblablement pas dû à la maturation tardive de l'amygdale et doit donc se faire grâce à un autre acteur.

L'âge de la transition entre les réponses de préférence et d'aversion correspond à la fin de la période d'hypo-réponse au stress que je mentionnais plus tôt. Au cours de cette période, les niveaux des hormones de stress du raton ne sont pas augmentés lorsque celui-ci est soumis à un choc (Levine 1970) ou exposé à un prédateur (Moriceau et al. 2004; Takahashi 1994a) et la synthèse de corticostérone (CORT) par les glandes surrénales n'est pas augmentée par l'injection d'hormone corticotrope (ACTH ; Levine 1994 ; pour revue, voir Lupien et al. 2009). La CORT pourrait donc jouer un rôle déterminant dans la transition entre l'apprentissage de préférence et l'apprentissage de peur. En effet, l'injection systémique de CORT à PN8 permet un conditionnement précoce de peur à l'odeur associé à une activation de l'amygdale (mesurée en 2-DG) et une absence d'activation du bulbe olfactif, alors qu'une adrénalectomie (retrait chirurgical des glandes surrénales responsables de la synthèse de CORT) permet à l'inverse de prolonger la période sensible, et d'induire une préférence à l'odeur chez les ratons de PN10 à PN15. Cet effet de l'adrénalectomie est réversé par une injection de CORT exogène (Moriceau and Sullivan 2004a; Moriceau et al. 2006, 2009). Lorsque la CORT est présente en quantité suffisante, elle permet donc l'activation de l'amygdale et une réponse de peur, alors que des niveaux trop faibles ne permettent pas l'implication de l'amygdale dans le conditionnement et le raton développe une préférence à l'odeur via les circuits de l'attachement. Cette capacité de la CORT à contrôler l'activation de l'amygdale se termine à PN15 (Upton and Sullivan 2010). Des études *ex vivo* ont montré que la plasticité synaptique de l'amygdale se développait après la fin de la période sensible (Thompson et al. 2008). Les auteurs font l'hypothèse que cette émergence de la plasticité de l'amygdale pourrait dépendre de la maturation du système GABAergique qui est lui-même modulé par la CORT.

Enfin, le niveau de CORT du raton peut être augmenté de manière précoce par des conditions de vie adverses au cours des premiers jours de vie : le laboratoire de Regina Sullivan a utilisé un paradigme de stress précoce en hébergeant des mères avec leur portée dans des cages avec trop peu litière pour fabriquer un nid (Blaze et al. 2015; Gilles et al. 1996; Raineki et al. 2010b; Roth and Sullivan 2005). Dans de telles conditions, la mère passe beaucoup de temps à essayer de construire un nid, au détriment des soins normalement prodigués aux ratons et du temps passé dans le nid. Elle a également plus d'interactions douloureuses avec eux (transport éprouvant pour le raton, piétinement,… Roth and Sullivan 2005; Raineki et al. 2010b). Les ratons présentent alors une augmentation de CORT précoce qui favorise un conditionnement de peur à l'odeur avant PN10. Une injection systémique d'un antagoniste de la CORT réverse ce conditionnement de peur (il rétablit une réponse de préférence à l'odeur) et diminue l'activation de l'amygdale (Moriceau et al. 2009; Raineki et al. 2010b).

L'ensemble de la littérature présentée dans ce chapitre a été l'objet de la rédaction d'un article de revue dans Learning & Memory (voir Annexe 1) dont il a fait la couverture :

Boulanger Bertolus J, Mouly A-M, Sullivan R.M. Ecologically Relevant Neurobehavioral Assessment of the Development of Threat Learning. En revue à Learning & Memory.

Le conditionnement associatif entre une odeur et un choc est donc nettement modifié au cours du développement du raton, tant en terme de réponse conditionnée induite qu'en terme de réseau neuronal impliqué. Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés au conditionnement de peur à l'odeur depuis les premiers jours auxquels il est possible (PN12-15) jusqu'à l'âge adulte. Un tel conditionnement permet au sujet de prédire qu'une odeur donnée signale l'arrivée d'un choc. Toutefois,

l'information fournie pendant le conditionnement est plus précise encore : l'intervalle temporel entre le début de l'odeur et le choc est fixe. Il est donc également possible de prédire à quel moment précis le choc va arriver. C'est cette capacité de mémoire temporelle que nous avons étudiée dans la première partie de cette thèse.

Afin d'étudier cette réponse émotionnelle temporelle du raton tout au long de l'ontogenèse, il est nécessaire de disposer d'outils de mesure de son état émotionnel adapté à tous les âges étudiés. Ces outils doivent présenter eux-mêmes une bonne résolution temporelle et leurs modifications au cours du développement doivent être connues et maitrisées. Je vais donc commencer par décrire plusieurs mesures de la réponse de peur du rat ainsi que leur ontogenèse.

Chapitre 4

Mesurer la peur

I. L'expression comportementale de la peur

Au début des années 1970, Robert C. Bolles développe la théorie de réaction de défense espèce-spécifique (*species-specific defense reaction*). Cette théorie stipule que le rat en liberté doit se défendre dans des situations extrêmement variées et qu'il a développé pour cela un ensemble de réactions comportementales de défense primaires aux situations qu'il peut rencontrer, rapides à mettre en œuvre et adaptées à la majorité des situations de danger (pour une revue du travail de Robert C. Bolles, voir Crawford and Materson 1982). Dans une situation de danger imminent, le répertoire des réactions de défense adaptées est réduit à un sous-ensemble de comportement innés : l'immobilité totale (ou immobilité de peur, appelée couramment *freezing* dans la suite de ce manuscrit), la fuite ou le combat. A ces réponses de défense espèce-spécifiques, Crawford et Materson (1982) ajoutent les comportements de recherche (de la source du stimulus aversif dans le cas de l'estimation du risque – *risk assessment* , d'une sortie,…), le forage de défense (*defense digging*) et le thigmotactisme (mouvement visant à générer un contact physique, par conséquent à éviter les zones ouvertes).

1. Le freezing

Le freezing a été défini comme une immobilité totale, à l'exception des mouvements respiratoires, en réponse à une menace (Blanchard and Blanchard 1969a; Bouton and Bolles 1980; Fanselow 1980). Il est souvent caractérisé par une position typique de l'animal, ramassé sur lui-même et contracté, prêt à fuir ou attaquer si la situation menaçante rend ces autres réactions de défense plus adaptées (Blanchard and Blanchard 1989). La position des oreilles en arrière, le poil hérissé sont d'autres indices permettant à l'expérimentateur d'identifier le freezing par rapport à une simple immobilité calme (Bolles and Collier 1976). Le fait que le rat fasse du freezing plutôt qu'une autre réponse de défense dépend également de son niveau de peur, de la proximité de la menace et de paramètres environnementaux tels que la présence d'une échappatoire ou la taille de la cage dans laquelle il est en situation de laboratoire (Blanchard and Blanchard 1971; Fanselow 1994; mais voir Kabitzke and Wiedenmayer 2011).

Le freezing est rapidement devenu un outil standard de mesure de la réponse de peur. En effet, outre le fait que c'est un comportement facilement induit et mesurable chez le rongeur, il a également rapidement été possible d'en automatiser la détection (Anagnostaras et al. 2010, 2000), permettant ainsi d'augmenter le nombre d'animaux enregistrés en parallèle, la reproductibilité des mesures et diminuant le taux d'erreurs liées à la subjectivité et à la fatigue de l'expérimentateur.

Le freezing tel que caractérisé chez l'adulte (position du corps, des oreilles, piloérection,…) n'apparaît qu'à partir de PN23 (Bolles and Woods 1964). Chez les ratons plus jeunes, il est possible de mesurer un freezing moins complexe dès PN10, caractérisé par une immobilité avec tensions musculaires (tête maintenue surélevée du plancher par exemple). Ce freezing chez le raton a été étudié en particulier en réponse à la présence d'un rat mâle adulte non-familier (Moriceau et al. 2004; Takahashi 1994a, 1994b). En effet, les rats mâles adultes sont des prédateurs pour les ratons qu'ils n'ont pas élevés, qu'ils tuent, assurant ainsi la réceptivité de la femelle (une ratte qui allaite n'est pas réceptive à une nouvelle fécondation) et leur propre succès reproductif.

Chez le raton, l'étude de la réponse de peur peut donc être réalisée en réponse à un stimulus inconditionné menaçant, mais également en réponse à un stimulus conditionné. Dans le cas d'un conditionnement de peur il est intéressant de noter que l'apparition de la réponse conditionnée de freezing n'est pas directement liée à la capacité à percevoir ou non le SC. En effet, ainsi que mentionné

chapitre 3, le raton naît aveugle, sourd et avec une faible mobilité et coordination musculaire. La coordination musculaire apparaît progressivement, la marche se développe vers PN10, les canaux auditifs s'ouvrent vers PN12 et les yeux vers PN14 (Alberts 1984; Altman and Sudarshan 1975; Anderson and Patrick 1934; Bolles and Woods 1964). Ces considérations peuvent suggérer une apparition du freezing à un stimulus conditionné vers PN12 pour un stimulus auditif et PN14 pour un stimulus visuel. Or des études ont pu montrer que le raton exprime du freezing à un stimulus conditionné auditif à PN15-16 et PN17-18 lorsque le stimulus est visuel (Moye and Rudy 1985; Hunt and Campbell 1997 voir paragraphe III de ce chapitre pour une courte discussion de ces décalages d'expression du freezing). Par conséquent, s'il est possible d'étudier le freezing chez le raton passé un certain âge, il faut être vigilant quant aux interprétations des résultats en termes d'apprentissage.

2. L'évitement

Ainsi que mentionné plus haut, lorsqu'il lui en est donné la possibilité, le rat ou le raton fuit le stimulus ou les conditions qui lui sont adverses. Ainsi, lorsqu'une échappatoire est à sa disposition, le rat adulte fuit la présence d'un prédateur, quitte à traverser un couloir électrifié pour pouvoir s'échapper (Blanchard and Blanchard 1971).

Chez le raton, ce comportement peut être visible très tôt. Une température non physiologique, par exemple, représente un danger pour le nouveau-né qui n'a pas encore la capacité de thermorégulation (Gordon 1990). Il a été montré que dès le jour de la naissance, moyennant que l'expérimentateur lui en laisse le temps, le raton est capable de s'orienter sur un gradient de température (17-45°C), évitant les températures extrêmes pour rejoindre des températures plus modérées (35-40°C, Kleitman and Satinoff 1982).

Par ailleurs, nous avons vu au chapitre 3 qu'une odeur pouvait acquérir une valence négative lorsqu'elle était associée à un SI intéroceptif aversif. Dans ce cas, le raton développe une réponse d'évitement de l'odeur qui a été étudiée dès la fin de la première semaine de vie (Haroutunian and Campbell 1979; Moriceau et al. 2009; Raineki et al. 2010b, 2009; Rudy and Cheatle 1977). Johanson et Teicher (1980) mentionnent même qu'il est possible de mesurer l'aversion non conditionnée des ratons à une odeur en mesurant le temps relatif passé sur la dite odeur dès PN3. La réponse d'évitement est généralement mesurée en utilisant un labyrinthe en Y (voir Figure 16) ou une cage munie d'un plancher à trous sous lequel sont placées les odeurs à tester.



Figure 16 : Photo d'un labyrinthe en Y utilisé pour tester l'évitement du raton (Sevelinges 2006)

3. L'inhibition et l'activation comportementale

Les paragraphes précédents montrent que le comportement de l'animal permet de mesurer sa perception et/ou sa mémoire du danger. Freezing et évitement sont des comportements directement liés à la peur. Toutefois, la peur peut également modifier l'activité normale de l'animal et mesurer cette activité en présence d'un stimulus menaçant par rapport à une valeur référence apporte également des informations sur la peur de l'animal.

De fait, l'inhibition comportementale peut permettre de mesurer l'état émotionnel de l'animal : lorsqu'il a peur, le rat supprime un ensemble de comportements non-défensifs tels que l'exploration, le toilettage, la prise de nourriture ou de boisson ou encore l'exploration (Blanchard and Blanchard 1989; Blanchard et al. 1990; Maren 2008; Pisano et al. 2012; Revillo et al. 2014). Cette suppression peut être mesurée en soi par l'expérimentateur pour estimer l'état émotionnel de l'animal (Pisano et al. 2012), mais elle peut également être mesurée via un paradigme de suppression conditionnée. Le paradigme de suppression conditionnée a été développé par Estes et Skinner (1941), en utilisant la célèbre « boîte de Skinner » (voir Figure 17) et comporte deux étapes. Dans un premier temps on entraîne un rat à appuyer sur un levier pour obtenir de la nourriture, puis, dans un second temps, il est soumis à un conditionnement de peur dans lequel un son précède l'arrivée d'un choc électrique. L'animal est ensuite replacé dans la boîte de Skinner où il reprend ses appuis sur levier pour obtenir de la nourriture. Si l'on introduit alors le son conditionné, le rat diminue nettement ses appuis sur levier lors de la présentation du SC. On peut alors mesurer la suppression par la formule :

$$\frac{taux\ d'appui\ levier\ au\ cours\ du\ SC}{taux\ d'appui\ levier\ au\ cours\ du\ SC\ +\ taux\ moyen\ au\ cours\ de\ l'intervalle\ inter-essai}$$

La suppression est alors comprise entre 0 (suppression totale de l'appui levier) et 0.5 (pas de suppression, i.e. même nombre taux d'appui levier au cours de l'intervalle inter-essai et du SC).

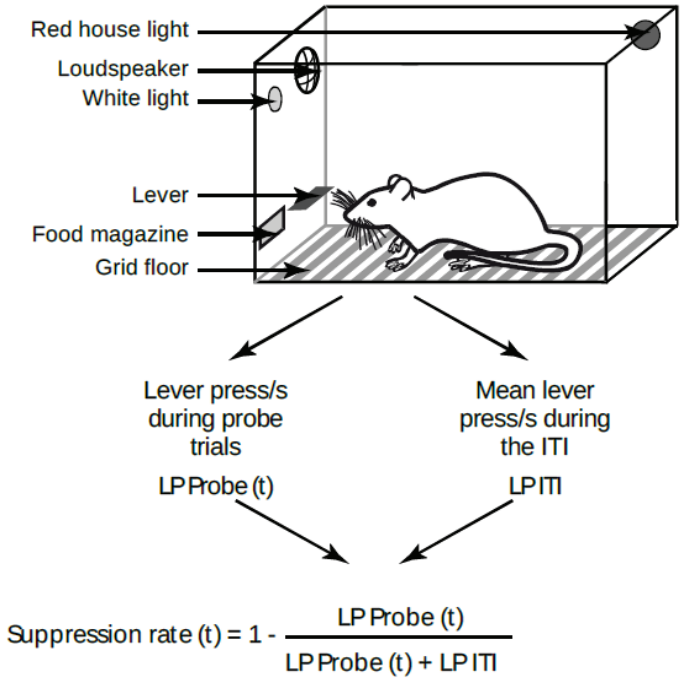


Figure 17 : Dispositif de mesure de suppression conditionnée à un son et formule pour la mesurer (adapté de Boulanger Bertolus et al. 2015, la formule de la suppression est ici légèrement modifiée pour des raisons de présentation des résultats).

La suppression conditionnée telle que réalisée dans une boîte de Skinner nécessite des capacités motrices relativement fines pour contrôler l'appui levier et est donc peu adaptée à une mesure sur le raton avant l'âge du sevrage. Bien que l'on puisse imaginer des variantes adaptées à la motricité du raton, à ma connaissance, cette mesure n'a pas été utilisée chez eux jusqu'à présent.

Par contre, le raton développe des comportements caractéristiques de son espèce très tôt. La toilette par exemple est visible dans sa forme la plus rudimentaire dès de 2ème jour de la vie du raton (Bolles and Woods 1964). La locomotion se développe également dès les premiers jours de la vie du raton. Si le déplacement se fait en rampant dans les premiers jours, le raton commence à marcher de manière rudimentaire dès PN10 et marche à proprement parler et se dresse vers PN14 (Altman and Sudarshan 1975; Bolles and Woods 1964). Avec ces développements locomoteurs, le raton commence également à explorer son environnement. Les premières explorations hors du nid sont observées vers PN10, le raton quittant régulièrement le nid à partir de PN14 (Bolles and Woods 1964). Il devient alors possible de mesurer l'effet d'une menace sur la prévalence de ces comportements : ainsi, lorsque les ratons sont soumis à une menace, la toilette est interrompue, l'activité locomotrice est réduite, l'exploration horizontale et verticale diminuée et la défécation augmentée (Bronstein and Hirsch 1976; Hubbard et al. 2004; Pisano et al. 2012; Revillo et al. 2014).

Toutefois, comme pour le freezing, l'activité locomotrice est modulée par le niveau de peur du raton, la proximité de la menace et des paramètres environnementaux tels que la taille de la cage. En effet, certaines situations comme l'odeur d'un prédateur inhibent l'activité locomotrice d'un raton de 12 jours, (Hubbard et al. 2004; Moriceau et al. 2004; Takahashi 1994a, 1994b). Au contraire, si un choc a été présenté peu de temps auparavant (danger immédiat), l'arrivée d'une odeur qui prédit le choc augmente drastiquement l'activité du raton (Boulanger Bertolus et al. 2014; Hunt 1997).

4. La potentialisation du sursaut

Parmi les autres mesures utilisées pour mesurer la peur, la potentialisation du sursaut est également très répandue. Cette mesure utilise le sursaut d'un individu à un son intense et soudain. L'état émotionnel de l'individu module grandement l'ampleur du sursaut : lorsque le son déclenchant le sursaut est présenté en présence d'un stimulus qui a précédemment été associé à des chocs, le sursaut est potentialisé (Brown et al. 1951; Davis 1979). Cette potentialisation est bien liée à l'anticipation du choc puisque si ce même son est présenté en présence d'un stimulus signalant une période sans choc (signal de sécurité ou *safety signal*), la potentialisation du sursaut est diminuée (Falls and Davis 1995). Enfin, un état émotionnel positif de l'individu comme l'arrivée imminente d'un renforcement alimentaire pour un animal affamé inhibe le sursaut (Schmid et al. 1995). Il est intéressant de noter que la potentialisation du sursaut est une mesure également très utilisée chez l'homme, ce qui la rend particulièrement adaptée dans le cadre d'études translationnelles.

Le signal provoquant le sursaut requérant une audition mature, l'utilisation de cette mesure n'est pas possible chez le raton avant l'ouverture des conduits auditifs, vers PN14 (Anderson and Patrick 1934). Toutefois, une fois le sursaut au son établi, la potentialisation de ce sursaut par la peur n'est pas immédiate dans le développement du raton (Hunt and Campbell 1997; Hunt et al. 1994) : elle n'apparait qu'à PN23.

5. Autres comportements notables

Les vocalisations ultrasoniques peuvent également être enregistrées pour estimer la peur et/ou l'anxiété de l'animal. L'introduction de l'étude 2 est consacrée à une présentation plus approfondie et une discussion du lien entre état émotionnel et vocalisations ultrasoniques.

Parmi les autres comportements de défense du rat, on peut noter l'enfouissement défensif : ce comportement est observable lorsqu'une tige électrifiée est placée dans la cage du rat. Lorsqu'il touche la tige, il reçoit un choc électrique. Il répond alors en enfouissant la tige dans la litière. Un tel comportement est observable dès la troisième semaine de vie d'un raton (López-Rubalcava et al. 1996; revue par Wiedenmayer 2009).

L'attaque est également un comportement de défense du rat (Fanselow 1994). Les conditions expérimentales de laboratoire sont généralement peu propices à ce type de comportement et les sélections qui ont été pratiquées sur les rats de laboratoires depuis leur domestication ont créé des animaux peu agressifs qui ne privilégient pas ce mode de défense (Blanchard et al. 1986; Blanchard and Blanchard 1989). Toutefois, j'ai pu observer des comportements analogues à une réponse d'attaque dans le cadre de mes études (données non publiées) : lorsqu'ils sont soumis à un conditionnement de peur à l'odeur, certains animaux réagissent en attaquant les barreaux électrifiés ou la bordure du plancher. J'ai pu observer ce comportement à tous les âges que j'ai testé, y compris les plus jeunes (PN12-15). Cette observation n'a été faite que dans le cadre d'une session présentant des chocs. Les sessions ne présentant pas de stimuli inconditionnés (sessions de test de la réponse conditionnée au SC) ne permettent pas d'observer ces attaques. Un comportement d'attaque de l'objet électrifié a également été observé par Blanchard et Blanchard (1969b) chez l'adulte, et Collier et Bolles (1980) observent que des ratons de PN20 attaquent l'électrode fixée à leur queue quand celle-ci délivre un choc.

Enfin, le thigmotactisme est également une réponse qui peut être mesurée pour estimer le niveau de peur de l'animal. Le thigmotactisme est la recherche de contact physique du rat avec son environnement comme les murs de la cage. Il est très classiquement utilisé pour mesurer l'anxiété de l'animal dans le test de l'*openfield*, mais peut également être mesuré pour décrire la réponse du rat à un conditionnement pavlovien (Grossen and Kelley 1972).

J'ai décrit dans ces paragraphes un ensemble de modifications comportementales permettant d'estimer l'état émotionnel chez le rat. Il me semble important de préciser que l'étude des réponses comportementales de peur de l'animal ne devrait pas se limiter à une mesure unique (seulement le freezing, ou la réponse de sursaut), surtout dans le cadre d'une étude concernant l'ontogenèse d'un processus cognitif (la nécessité d'utiliser des paramètres complémentaires en parallèle a également été discuté par Antoniadis and McDonald 2000). En effet, nous avons vu que le comportement subit un changement continu et une réorganisation au cours du développement de l'animal. Par conséquent, la modification d'un processus cognitif peut être masquée par cette réorganisation du comportement. Par exemple, nous avons vu que la potentialisation du sursaut par un conditionnement de peur au son apparaît après le freezing suite à ce même conditionnement (PN23 vs PN15-16). Dans cet exemple, l'utilisation de la potentialisation du sursaut comme seule mesure de peur peut amener à conclure que le raton ne peut pas être conditionné par une association son-choc avant PN23, ce qui est faux. L'ajout de mesures physiologiques peut également en permettre une vision d'ensemble plus complète.

II. Les modifications physiologiques dues à la peur

Lorsqu'un rat est confronté à une menace, un ensemble de changements physiologiques permettent à son organisme d'appréhender le danger. Ces modifications comprennent une analgésie partielle (Wiedenmayer and Barr 1998), une modification des rythmes cardiaque et respiratoire (Graham and Clifton 1966; Frysztak and Neafsey 1991), ainsi qu'une modulation des hormones de stress (Wiedenmayer et al. 2003; Moriceau et al. 2004). Ces modifications physiologiques en présence d'un danger ont lieu à tous les âges développementaux et permettent d'estimer l'état émotionnel de l'animal.

1. Modulation des hormones de stress

Lorsqu'un animal a peur, l'amygdale active l'hypothalamus latéral. Celui-ci sécrète alors la corticolibérine (ou CRH pour *corticotropin-releasing hormone* ou CRF pour *cortico-releasing factor*), qui active l'hypophyse (ou glande pituitaire) qui produit à son tour l'hormone corticotrope (ou adrénocorticotropine, ACTH), laquelle induit la secrétion d'un ensemble de corticoïdes par les glandes surrénales dont la corticostérone (ou CORT). La CORT permet alors la modulation de la réponse comportementale et physiologique de l'organisme et inhibe en retour la synthèse de CRF et d'ACTH. Ce système neuro-endocrine est appelé axe corticotrope (*hypothalamic–pituitary–adrenal axis* ou HPA axis en anglais, voir Figure 18). Chez l'adulte, les hormones ainsi sécrétées, CRF, ACTH et CORT, peuvent être dosées pour estimer le niveau de stress de l'organisme.

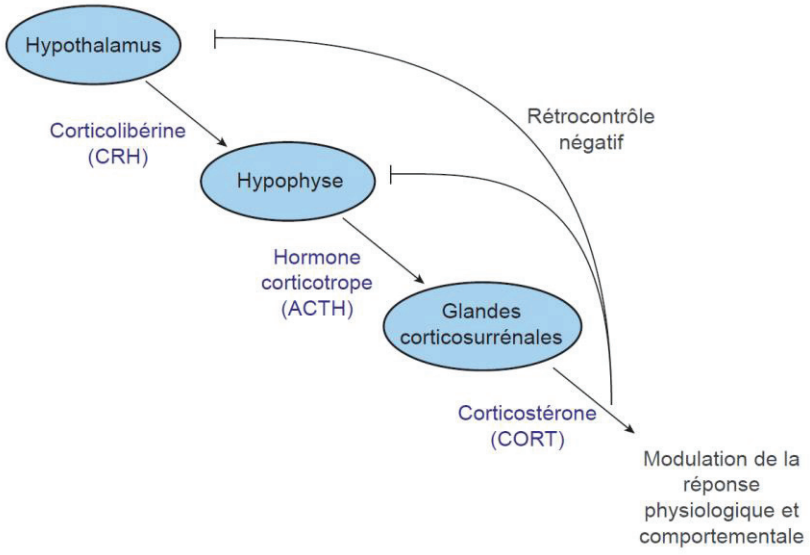


Figure 18 : Axe corticotrope.

Il est intéressant de noter que ce système ne se développe pas de manière uniforme : les différents composants de l'axe corticotrope deviennent fonctionnels à des moments différents de l'ontogenèse. Par exemple, pendant la période d'hyporéponse au stress au début de la vie du raton que nous avons présenté chapitre 3, la CORT est présente en quantités faibles dans le système et n'est pas augmentée par des situations normalement stressantes comme la présence d'un prédateur (Moriceau et al. 2004). Toutefois, ce déficit de CORT n'est pas dû à un déficit d'ACTH (qui en stimule la synthèse). En effet, une augmentation d'ACTH est observable dès PN7 en réponse à cette même présentation d'un prédateur (Takahashi 1992). Le déficit de CORT est dû à un défaut d'activation de sa synthèse par l'ACTH : une injection d'ACTH ne suffit pas à générer une augmentation de CORT circulante (Levine 1994). Par ailleurs, certaines situations peuvent permettre l'activation précoce de la

synthèse de CORT par le raton : l'isolement long du raton d'avec sa mère ou des maltraitances répétées au cours des premiers jours de vie permettent une augmentation précoce de la CORT (Levine 1994; Raineki et al. 2010b).

Par conséquent, il est possible de mesurer le niveau d'hormones de stress dès PN10 chez le raton mais des mesures plus précoces doivent prendre en compte la maturation de l'axe corticotrope.

2. Le rythme respiratoire

La respiration est principalement contrôlée par le système nerveux autonome. Toutefois, elle peut également être contrôlée par des structures supérieures du système nerveux : les neurones du centre de régulation de la respiration reçoivent des afférences du cortex. Ces afférences permettent le contrôle volontaire de la respiration (le fait que l'on peut retenir volontairement sa respiration ou la moduler par exemple). Elles permettent également une modulation moins consciente : la respiration peut être affectée par une activation de l'organisme, son activité cognitive ou ses émotions (Homma and Masaoka 2008; Stevenson and Ripley 1952; Boiten et al. 1994; Boiten 1998; Ley 1999; Hegoburu et al. 2011).

En ce qui concerne les émotions, Clarke et Trowill (1971) ont ainsi montré que la fréquence respiratoire du rat était augmentée suite à une stimulation intra-cérébrale récompensante. Mais la fréquence respiratoire est également sensible à l'apprentissage : lorsque les stimulations intra-cérébrales récompensantes sont présentées à intervalle fixe de 20 s, la fréquence respiratoire n'est plus augmentée par l'arrivée de la stimulation récompensante mais par son anticipation (Clarke and Trowill 1971). Cette modification de la respiration par la mémoire émotionnelle a aussi été étudiée en utilisant le conditionnement de peur. Freeman et al. (1983) montre par exemple que chez les lapins, la réponse respiratoire est un bon indice de la discrimination entre deux odeurs de valence apprise différente : une odeur associée à des chocs induit des épisodes de flairage lorsqu'elle est présentée alors qu'une autre qui n'est pas renforcée est rapidement ignorée et n'induit plus de flairage. Chez le rat adulte, un conditionnement aversif module le rythme respiratoire, mais le sens de la modulation dépend du stimulus inconditionné utilisé : lorsqu'un SC est associé à un choc électrique ou à une hypoxie, sa présentation induit une augmentation du rythme respiratoire et/ou de la ventilation (Frysztak and Neafsey 1991; Nsegbe et al. 1999; Shionoya et al. 2013). Au contraire, lorsque le SC est associé à une exposition à un air surchargé en CO_2 (hypercapnie), il induit une diminution du rythme respiratoire lorsqu'il est présenté seul par la suite (Nsegbe et al. 1997). Le rythme respiratoire est également modifié entre les présentations du stimulus conditionné par rapport à des rats contrôles non-conditionnés (Frysztak and Neafsey 1991; Hegoburu et al. 2011; Shionoya et al. 2013). Chez le rat adulte, une modulation de la respiration peut donc refléter l'état émotionnel de l'individu.

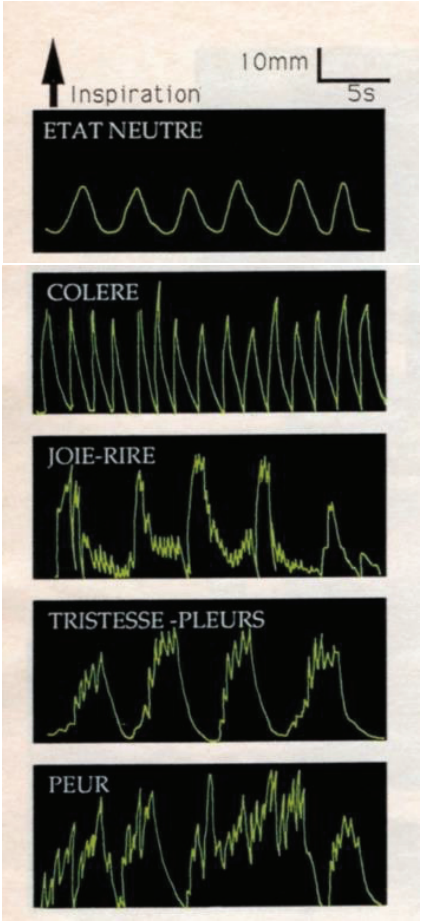


Figure 19 : Enregistrement de la respiration de sujets sous hypnose rapportant des émotions très intenses. A chaque type d'émotion correspond un profil particulier de respiration (adapté de Bloch 1989).

Le raton est également capable de moduler sa ventilation en réponse à une hypercapnie (Mortola and Lanthier 1996). Nous montrerons au chapitre 6 que sa fréquence respiratoire est également modulée par un conditionnement de peur à l'odeur et l'arrivée d'un stimulus conditionné (Boulanger Bertolus et al. 2014).

3. Le rythme cardiaque

Une modification du rythme cardiaque peut aussi permettre de mesurer la réponse de peur à tous les stades de développement. Notons toutefois que le sens de la modulation (une augmentation ou une diminution du rythme cardiaque en présence du stimulus menaçant) n'est pas constant au cours du développement et entre différentes études (en lien avec la nature du stimulus inconditionné par exemple). Par exemple, lorsqu'une odeur est associée à un choc, la présentation subséquente de l'odeur conduit à une augmentation du rythme cardiaque chez le raton de PN16 et à une diminution du rythme cardiaque chez les adultes (Hunt et al. 1997).

4. Analgésie

Un ensemble de situations aversives peuvent induire une analgésie chez le rongeur comme la présence d'un prédateur (Lester and Fanselow 1985) ou une défaite lors d'interactions agonistiques (Miczek et al. 1982). Cette analgésie peut être médiée ou non par le système opioïde (Lewis et al. 1980; Snow et al. 1982) et est supposée empêcher que des dommages tissulaires interfèrent avec la défense de l'animal (Bolles and Fanselow 1980). Le raton développe également une analgésie lors de situations

aversives comme un isolement (Spear et al. 1985) ou l'exposition à un prédateur (Wiedenmayer and Barr 1998). Dans le cas de l'exposition à un mâle adulte prédateur, cette analgésie est développée au cours de la deuxième semaine de vie du raton et disparait après le sevrage, date à laquelle le mâle ne constitue plus une menace pour le raton (Wiedenmayer and Barr 1998). Toutefois, lorsqu'il est isolé de sa mère pendant 30 min, le raton développe une analgésie dès PN6, démontrant que les mécanismes neurobiologiques de l'analgésie sont fonctionnel dès cet âge (Spear et al. 1985).

III. Exprimer une réponse de peur : les structures impliquées

Je ne détaillerai pas en détail les différents réseaux qui contrôlent les réponses comportementales et physiologiques de peur, ce n'est pas ici l'objet de cette thèse. La Figure 20 présente un résumé des circuits supposés impliqués dans ces différentes réponses à partir de l'activation de l'amygdale centrale, noyau amygdalien largement impliqué dans l'expression de la réponse de peur (figure réalisée à partir de Davis 1992b; Fanselow 1994; Wiedenmayer 2009). Ce schéma bilan est réalisé chez l'adulte.

Chez le raton, les différents circuits deviennent fonctionnels à des moments différents du développement. Par exemple, nous avons évoqué au chapitre 2 que, chez l'adulte, la réponse de peur était sous contrôle du cortex préfrontal, via des modulations excitatrices et inhibitrices des cortex prélimbiques et infralimbiques respectivement. Toutefois, ce contrôle cortical de la réponse de peur semble ne se développer qu'après le sevrage, vraisemblablement à cause d'une maturation retardée du cortex préfrontal (King, Pattwell, Glatt, & Lee, 2014; Wiedenmayer, 2009). Par ailleurs, une maturation retardée des connections inter-structures, plutôt que des structures elles-mêmes, peut aussi expliquer l'apparition tardive d'une réponse de peur conditionnée. Ainsi, l'amygdale et le noyau caudal du pont réticulé sont tous les deux fonctionnels avant la maturation de la potentialisation du sursaut, mais la connexion entre ces deux structures ne devient fonctionnelle qu'après le sevrage (Richardson and Hunt 2009).

On peut voir sur la Figure 20 que certaines de ces réponses partagent des circuits communs, comme la réponse d'analgésie et d'attaque, alors que d'autres sont plus indépendantes. Ce recouvrement seulement partiel des circuits neurobiologiques illustre d'autant plus l'avantage qu'il y a de mesurer plusieurs réponses de peur en parallèle pour estimer l'état émotionnel de l'animal.

Ces circuits sont présentés de manière simplifiée. En effet, des études ont pu montrer que le circuit impliqué dans une même réponse de peur peut dépendre de la nature du stimulus menaçant : nous avons par exemple mentionné le fait que le freezing à un stimulus conditionné visuel apparaît après le freezing à un son. Ces décalages d'expression de la peur en fonction de la modalité informant le réseau pourraient être dus à connexions modalités-spécifiques entre les différents noyaux de l'amygdale et/ou dans les connexions entre l'amygdale et les structures effectrices (Hunt and Campbell 1997; Weber and Richardson 2004).

Par ailleurs, le réseau neuronal supportant la réponse de peur peut également dépendre de l'âge auquel le stimulus a acquis sa valence négative : ainsi une peur apprise à un certain âge peut continuer à être exprimée via les circuits neuronaux de l'âge d'apprentissage et rester indépendante des circuits qui sont devenus fonctionnels à l'âge de test (exemple du cortex prélimbique : Li et al. 2012).

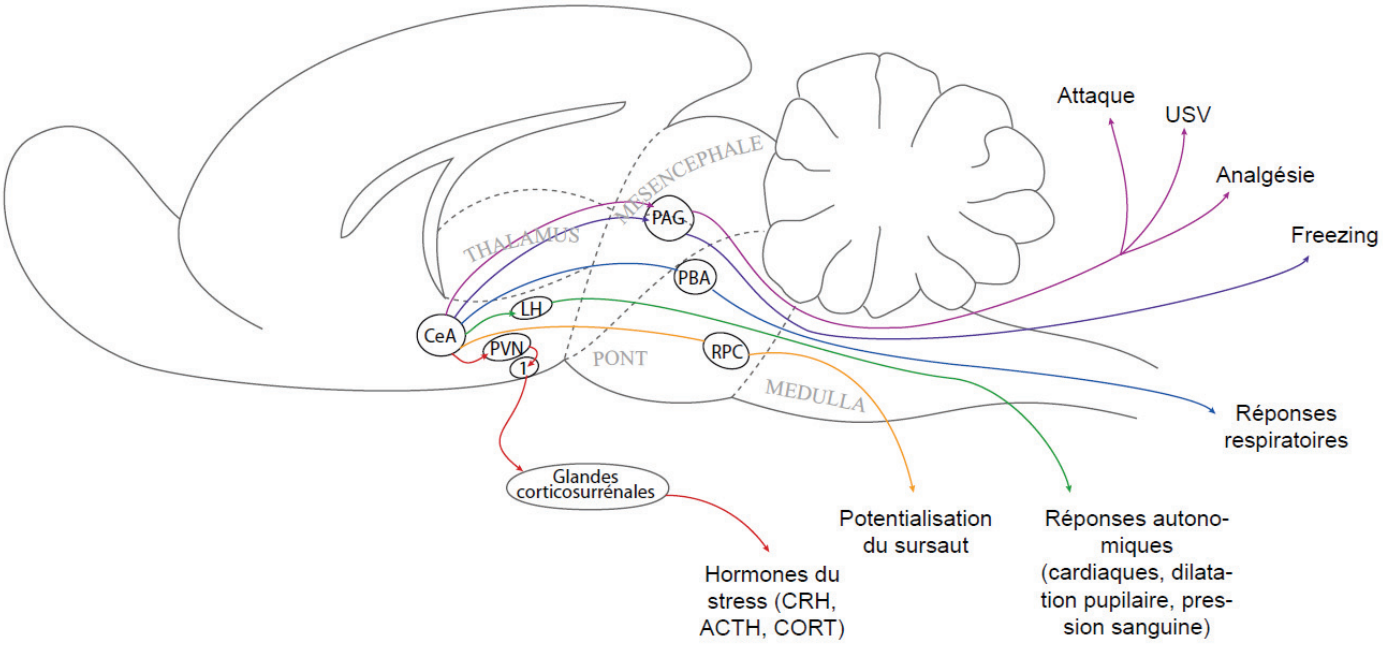


Figure 20 : Schéma de la neurobiologie de la réponse de peur à partir de l'activation de l'amygdale centrale, noyau de l'amygdale impliqué dans l'expression de la réponse de peur. 1 : hypophyse ou glande pituitaire ; CeA : amygdale centrale ; LH : hypothalamus latéral ; PAG : substance grise périaqueducale ; PBA : noyau parabrachial ; RPC : noyau caudal du pont réticulé.

IV. Conclusion

Nous avons pu constater que chez le rat, les réponses comportementales et physiologiques de peur à une menace ou un événement aversif sont très variées, et changent au cours de l'ontogenèse : de nombreux paramètres comportementaux et physiologiques peuvent être mesurés pour estimer la peur d'un animal. Ces paramètres n'apparaissent pas de manière simultanée au cours du développement de l'animal (Antoniadis and McDonald 1999). Il a été suggéré que cette expression séquentielle pourrait être due à une maturation séquentielle des voies qui les contrôlent (Hunt and Campbell 1997; Killcross et al. 1997; Richardson and Hunt 2009). Par ailleurs, la nature du stimulus menaçant peut également modifier l'expression de la peur. Pour toutes ces raisons, les mesures des différentes réponses de l'animal peuvent se complémenter pour appréhender de la manière la plus précise qui soit son état émotionnel.

Travail expérimental

Etude 1 : La réponse de peur conditionnée à l'odeur et l'estimation temporelle

Introduction à la perception de la durée du stimulus conditionné

La première partie de ce travail de thèse a été consacrée à l'étude de l'ontogenèse de l'estimation temporelle dans le conditionnement de peur à l'odeur. En effet, lorsque l'odeur est associée à un choc, le rat apprend le lien causal entre les deux évènements mais un rat adulte est également capable de mémoriser l'intervalle de temps qui les lie. Cela se traduit par l'émergence d'un motif dans le décours temporel dans la réponse de peur, en lien avec la durée de cet intervalle. Cependant, la capacité des ratons à encoder cet intervalle était jusqu'à présent inexplorée. Je vais, dans un premier temps présenter ce qu'est l'estimation temporelle et l'état de l'art sur la question dans le cas d'une odeur conditionnée. Cette introduction sera suivie de l'étude que nous avons réalisée sur l'ontogenèse de l'estimation de la durée de l'odeur conditionnée.

I. Estimation temporelle

1. Qu'est-ce que l'estimation temporelle ?

La perception du temps (l'estimation de la durée d'intervalles de temps) est une capacité cognitive essentielle à l'anticipation des événements de la vie de tous les jours et la production de comportements qui y sont adaptés. C'est une capacité qui est partagée par un grand nombre d'espèces vertébrées et invertébrées et qui peut être divisée en trois catégories selon les durées concernées (pour une revue, voir Buhusi and Meck 2005). Une première catégorie concerne les durées de l'ordre de la milliseconde. Ce sont les intervalles impliqués dans la coordination fine des mouvements, la séparation des mots lorsque l'on parle, la production de musique,… A l'extrémité opposée des intervalles qui sont perçus, le temps circadien fait référence au cycle jour – nuit de 24h et contrôle le cycle veille – sommeil, la prise alimentaire, les taux hormonaux… La troisième catégorie est celle qui nous intéresse dans cette thèse : les intervalles de l'ordre de la seconde à la minute. La capacité à mesurer, encoder et utiliser de tels intervalles intervient dans notre vie de tous les jours, généralement de manière inconsciente. Cette capacité permet de créer des cartes temporelles de notre environnement, c'est-à-dire d'encoder la manière dont les événements sont reliés les uns aux autres dans le temps (Miller and Barnet 1993; Balsam and Gallistel 2009). Nous sommes ainsi capables d'interagir avec cet environnement de manière appropriée : vous savez par exemple que votre navigateur internet ne répond plus parce que ça fait trop longtemps qu'il charge une page par rapport au temps que ça lui prend d'habitude. Vous avez fait une estimation temporelle pour faire cette déduction en comparant la durée que vous venez de percevoir à des durées références que vous aviez mémorisé (utilisation de votre mémoire des intervalles de temps).

Ces trois catégories temporelles sont encodées par des réseaux neuronaux distincts ce qui leur donne des caractéristiques psychophysiques différentes. La précision avec laquelle le temps y est encodé est différente par exemple (voir Figure 21). Dans le cas de la mémoire des intervalles, la précision avec laquelle un intervalle est perçu suit la propriété scalaire.

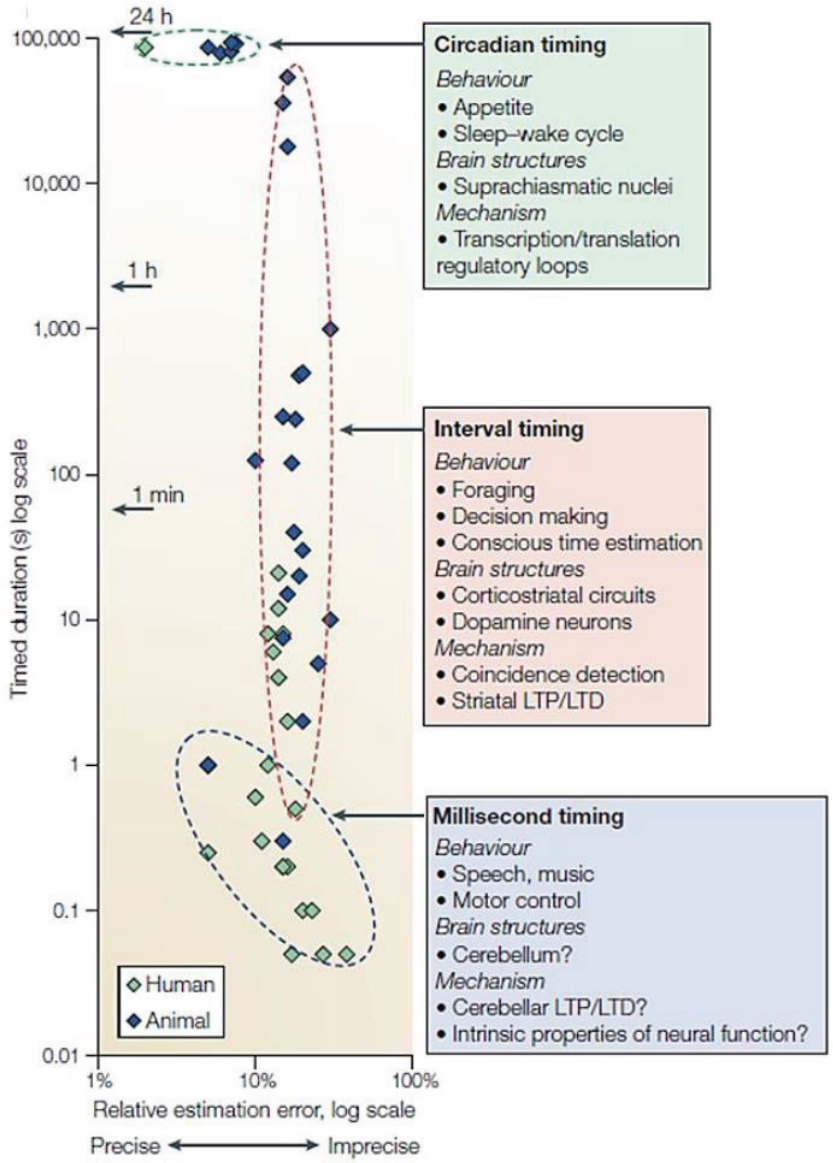


Figure 21 : La perception temporelle à différentes échelles de temps. Différentes données issues d'expériences chez l'homme et l'animal représentées par la précision de l'estimation temporelle des sujets en fonction de la durée à mesurer. On observe des lois différentes pour les trois catégories de durées : la performance est précise (mais peu flexible) pour des durées de l'ordre de la journée, moins précise (mais plus flexible) pour les intervalles de la seconde à l'heure et accepte une précision intermédiaire pour des durées de l'ordre de la milliseconde (Buhusi and Meck 2005)

2. La propriété scalaire

La propriété scalaire est une application de la loi de Weber à la perception temporelle. La loi de Weber stipule que la résolution d'une perception diminue proportionnellement à l'intensité du stimulus. Appliquée à une perception temporelle, cela signifie qu'il vous sera beaucoup plus facile de discriminer 1 et 3 s que 20 et 22 s alors que les intervalles à discriminer diffèrent de 2 s dans les deux conditions. Cette propriété implique que des comportements temporels adaptés à des durées différentes accepteront un coefficient de variation proportionnel à ces durées (voir

Figure 22 pour un exemple). Par conséquent, plus une durée est longue, plus la courbe du comportement qui y est adapté est « large » (ou « étalée »), et si des courbes sont normalisées par leur durée cible respectives, elles se superposent.

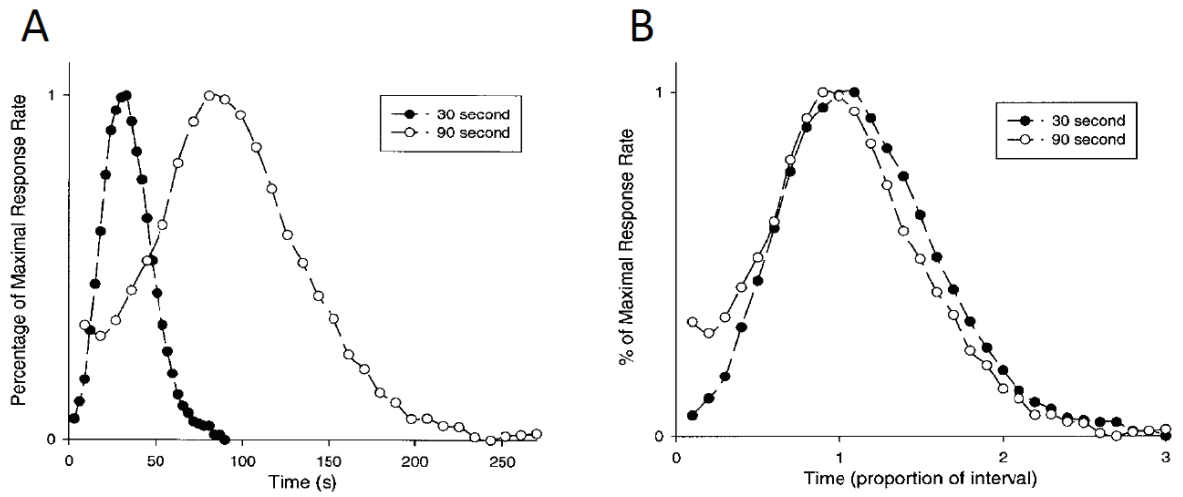


Figure 22 : Décours temporel d'un comportement suivant la propriété scalaire. A. Comportement de rat devant répondre à 30 ou 90 s pour obtenir une récompense. Chaque courbe présente un pic au temps optimal pour obtenir la récompense mais la précision est meilleure pour 30 que 90 s. Toutefois, si le temps est présenté de manière relative à l'intervalle cible (B), les courbes se surimposent, montrant ainsi que la précision de la perception temporelle (le coefficient de variation, i.e. la largeur de la courbe) est proportionnelle à l'intervalle à mesurer (Matell and Meck 2000).

3. Comment étudier l'estimation temporelle ?

a. La procédure de renforcement à intervalle fixe (*Fixed Interval*, FI) et de *Peak Interval* (PI)

Les procédures de renforcement à intervalle fixe (FI) et de *Peak Interval* (PI) sont des protocoles classiques pour étudier l'estimation temporelle dans de nombreuses espèces (poisson, pigeon, rat, singe, humain). Elles permettent d'en comprendre les caractéristiques psychophysiques et de chercher les substrat neuronaux qui la permettent.

Dans un protocole de FI, un stimulus inconditionné est administré si le sujet produit une réponse après une période réfractaire pendant laquelle aucun stimulus n'est délivré. Par exemple, dans le cas d'un conditionnement appétitif, une récompense arrive au bout d'un intervalle fixe seulement si le sujet appuie sur un levier après la fin de la période réfractaire (i.e. l'intervalle de temps à apprendre). Le sujet optimise alors sa réponse : il n'appuie que peu au début de l'intervalle et répond principalement vers la fin de l'intervalle appris (Lejeune 1992).

Le protocole de PI est une variante du protocole de FI qui consiste à introduire des essais non renforcés au cours desquels le renforcement est omis. Dans ce cas, le sujet arrête de produire sa réponse après le temps auquel l'arrivée du renforcement était estimée. Le taux de réponse moyen sur un essai non renforcé accepte donc un pic au temps auquel le sujet estime l'arrivée de la récompense due, et la largeur de ce pic permet d'estimer la précision avec laquelle le sujet mesure le temps (

Figure 22). La largeur du pic suit la propriété scalaire qui était présentée au paragraphe précédent (Matell and Meck 2000).

Ces procédures peuvent également utiliser un renforcement aversif : lorsque des chocs électriques sont délivrés de manière régulièrement espacée, la réponse de peur de l'individu est maximale au temps auquel le choc est attendu (LaBarbera and Church 1974) et l'omission d'un choc conduit à une réponse de peur présentant un pic au temps auquel le choc est attendu (Drew et al. 2005).

b. La procédure de bissection temporelle (discrimination temporelle)

D'autres paradigmes étudiant l'estimation temporelle sont basés sur la discrimination de durées d'un stimulus. Pour estimer ensuite si la durée a été correctement perçue, on peut alors demander au sujet de la comparer à une autre durée. Par exemple, une tâche classiquement utilisée pour caractériser l'estimation temporelle est la bissection temporelle. Le sujet reçoit deux sons de durées dites de référence, la plus courte associée à une réponse A (ex : appui sur le levier droit pour avoir la récompense), la plus longue à une réponse B (ex : appui sur le levier gauche pour avoir la récompense). Lorsque le sujet a correctement associé les durées de références avec les réponses appropriées, il lui est alors présenté un ensemble de durées intermédiaires qu'il caractérise en « courte » ou « longue » en répondant A ou B. Les réponses sont analysées en taux de réponse B pour chaque durée intermédiaire présentée (voir Figure 23) : on peut alors mesurer le point d'équivalence subjective des durées ainsi que la pente de la courbe qui estime la précision avec laquelle le sujet perçoit les durées (Church and Deluty 1977).

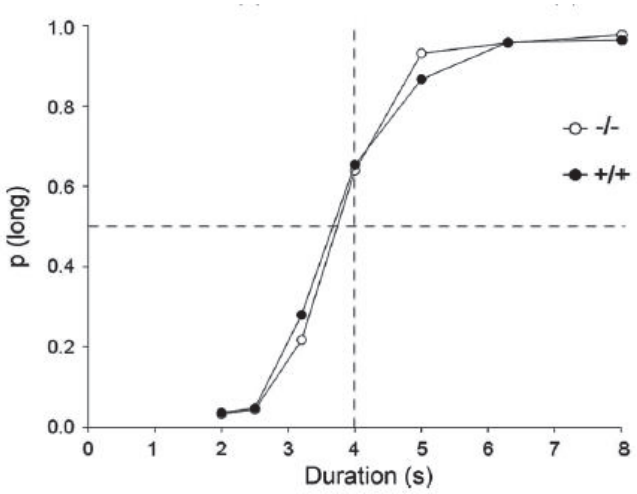


Figure 23 : Exemple de courbe de bissection temporelle. La probabilité de répondre « long » est tracée en fonction de la durée de l'intervalle présenté (extrait de Höhn et al. 2011).

c. Le conditionnement Pavlovien

Les protocoles de FI, PI et de bissection ont été largement utilisés pour étudier l'estimation et la mémoire temporelle. Toutefois, ces protocoles sont des protocoles opérants qui nécessitent un conditionnement en plusieurs sessions avec un nombre d'essais important. Ces procédures ne permettent donc pas d'étudier l'encodage de la mémoire temporelle, or, si l'expression de la mémoire temporelle peut nécessiter de nombreux essais pour être mise en place, l'encodage de l'intervalle SC-SI est réalisé dès les premières associations (Davis et al. 1989; Drew et al. 2005; Ohyama et al. 2006; Dìaz-Mataix et al. 2013; Shionoya et al. 2013). Certains auteurs suggèrent même que l'encodage des liens temporels précis entre les évènements serait un précurseur nécessaire à l'apprentissage associatif (Balsam et al. 2010; Kirkpatrick and Balsam 2016).

Dès les premières expériences de conditionnement associatif par Pavlov (1927), celui-ci avait observé que la réponse conditionnée était exprimée en anticipation de l'arrivée du SI : dans le cas de son expérience de conditionnement auditif appétitif chez le chien, si un délai était ajouté entre le son et la présentation de nourriture, la salivation était retardée et n'apparaissait que juste avant le moment auquel la nourriture était normalement présentée. Le chien de Pavlov est donc capable d'encoder la durée de l'intervalle SC-SI et d'y adapter son comportement.

Le conditionnement de peur est acquis en quelques essais seulement et certaines études ont mis en évidence que l'animal apprend très vite la durée de l'intervalle SC-SI dans cet apprentissage. La mémoire temporelle est mesurable de plusieurs manières : dans un conditionnement aversif (comme dans un conditionnement associatif appétitif, Deffains et al. 2011), la régularité temporelle facilite la réponse conditionnée. Par exemple, Davis et al (1989) ont montré que dans un conditionnement de peur mesuré par la potentialisation du sursaut, le sursaut était potentialisé de façon maximale quand le son brusque était présenté au moment auquel le choc était attendu, et ce après seulement une seule association dans certaines conditions. Plus récemment, Díaz-Mataix et al (2013) ont montré qu'une seule association son-choc était suffisante pour qu'un rat apprennent l'intervalle entre les deux évènements en montrant que les animaux détectaient une différence entre ce premier intervalle appris et un autre présenté le lendemain. D'autres études ont également analysé le décours temporel des réponses de peur pendant la présentation du SC dans un conditionnement de peur impliquant un plus grand nombre d'essais : cela permet d'observer un pic de la réponse de peur au moment où le choc est attendu lorsque le SI est omis (Boulanger Bertolus et al. 2015; Tallot et al. 2016).

4. Les structures neuronales support de la mémoire temporelle

Si plusieurs modèles possibles du réseau de la mémoire temporelle ont été proposés (pour une comparaison détaillée des différents modèles, voir Hass and Durstewitz 2014; pour une description plus simple et concise, voir Tallot 2015), les mécanismes neurobiologiques sous-tendant cette mémoire sont encore largement spéculatifs et débattus. Toutefois, l'implication de certaines structures ou systèmes semble consensuelle.

a. La boucle cortico-striato-thalamique et la dopamine

Le striatum

Un nombre croissant d'étude suggère que les ganglions de la base, traditionnellement impliqués dans un ensemble de processus cognitifs et motivationnels, seraient impliqués de manière critique dans le traitement de l'information temporelle. En effet, le striatum dorsal par exemple semble crucial dans la production d'un comportement temporel adapté : les études d'imagerie cérébrales chez l'homme montrent qu'il est activé par des tâches nécessitant perception et production temporelle (pour revue, voir Coull et al. 2011) et des enregistrements électrophysiologiques des neurones du striatum chez le singe montrent qu'ils présentent une activation vers la fin d'un intervalle, lorsque l'attente de la récompense est maximale (Apicella et al. 1992). Matell et collègues (2003) ont également montré que 22% des neurones du striatum d'un rat soumis à une procédure de PI admettaient un pic d'activité juste avant la fin de l'intervalle à encoder. Mello et al (2015) ont par ailleurs montré que les neurones du striatum du rat déchargent séquentiellement en réponse à des intervalles de temps. Cette activation séquentielle de neurones striataux est suffisante pour modéliser l'estimation temporelle de l'animal. Ce résultat est confirmé par Gouvêa et al (2015) qui montrent

également que la durée estimée d'un intervalle par le rat peut être prédite par l'activité des neurones de son striatum.

L'activité des neurones du striatum laissent donc prédire un rôle de cette structure dans l'estimation temporelle. Cette fonction dans l'estimation temporelle est confirmée par des lésions (voir Figure 24) : dans une tâche de PI chez le rat, léser le striatum dorsal empêche la production du comportement temporel sous forme de pic classiquement observé (Meck 2006b). De plus, dans une tâche de bissection temporelle, l'injection de muscimol, un agoniste GABAergique, dans le striatum dorsal diminue grandement la sensitivité de l'animal au temps (Gouvêa et al. 2015).

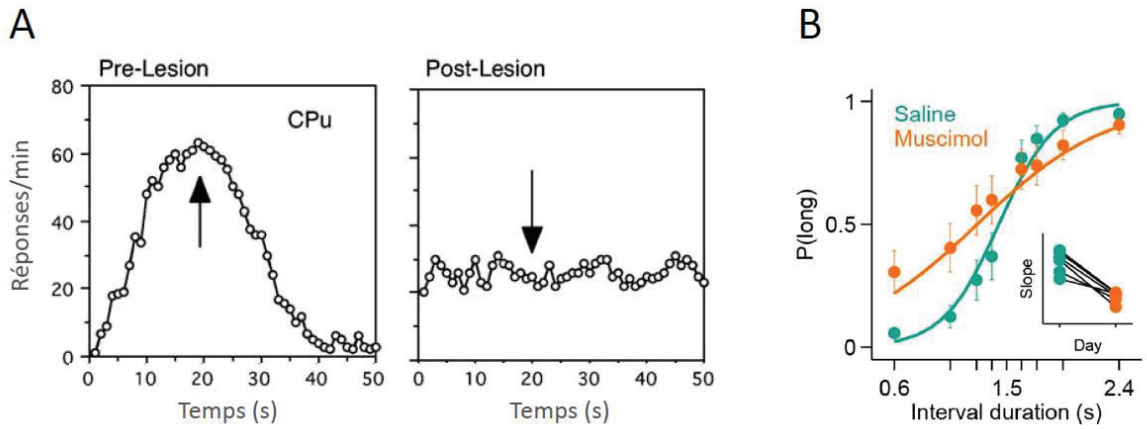


Figure 24 : Effet d'une perturbation de l'activité du striatum sur le comportement temporel. A. Effet d'une lésion du striatum (CPu) sur le comportement temporel au cours d'une tâche de PI (Meck 2006b). B. Effet d'une injection de muscimol dans le striatum au cours d'une tâche de bissection temporelle (Gouvêa et al. 2015).

Le cortex

Le cortex serait également impliqué dans l'estimation temporelle. En effet, chez l'homme il est activé dans un grand nombre de tâche impliquant une estimation temporelle (Coull et al. 2011). De plus, chez le rat, des enregistrements électrophysiologiques des neurones du cortex préfrontal montrent une modulation de leur taux de décharge cohérente avec un encodage du temps (Matell et al. 2003; Kim et al. 2013). Par ailleurs, l'injection de muscimol dans le cortex préfrontal diminue drastiquement la discrimination d'intervalles dans une tâche de bissection temporelle (Kim et al. 2009). Ainsi, le cortex préfrontal et le striatum seraient impliqués dans la perception et la mémorisation des intervalles de temps. En particulier, une plasticité de la voie de la voie préfronto-striatale semble nécessaire à une perception précise du temps (Höhn et al. 2011).

Le système dopaminergique

Le système dopaminergique serait également un acteur dans l'estimation d'intervalles de temps. En effet, l'injection systémique d'agoniste et d'antagonistes dopaminergiques conduit à des modifications de la durée subjective de l'intervalle à mesurer, à la fois chez l'animal (Drew et al. 2003) et chez l'homme (pour une revue, voir Coull et al. 2011). Ce rôle de la dopamine impliquerait en particulier le système dopaminergique issu de la substance noire pars compacta et innervant le striatum. En effet, chez le rat une lésion de la substance noire pars compacta a un effet équivalent à une lésion du striatum sur le décours temporel du comportement et l'administration systémique de

levodopa, un agoniste des récepteurs dopaminergiques, restaure le comportement temporel suite à cette lésion (Meck 2006b). De plus, Drew et collègues (2007) ont montré que des souris sur-exprimant le récepteur à la dopamine D2 de manière transitoire dans le striatum dorsal et soumises à une tâche de PI présentent un décours temporel de l'appui levier perturbé : le pic de réponse est plus large et plus tardif, suggérant une détérioration à la fois de la précision et de la justesse de l'estimation temporelle. Cette modulation dopaminergique de la perception temporelle se retrouve également au sein du cortex frontal : la lésion du cortex frontal empêche la modulation de la durée subjective de l'intervalle par l'injection de drogues dopaminergiques (Meck 2006a) et l'injection d'agonistes dopaminergiques dans le cortex frontal perturbe la mémoire temporelle (Parker et al. 2015). Pour une revue des études montrant le rôle de la dopamine dans la mémoire temporelle, voir Agostino et Cheng (2016).

Le modèle de Striatum Beat Frequency

Un modèle actuel des rôles du striatum, du cortex frontal et du système dopaminergique dans la mémoire temporelle est le modèle de *Striatum Beat Frequency* (Matell and Meck 2000; Buhusi and Meck 2005; Coull et al. 2011), qui s'appuie sur une boucle cortico-striato-thalamique, classiquement impliquée dans les tâches habituelles motrices et cognitives (Arnsten and Rubia 2012). Dans ce modèle, les neurones épineux GABAergiques (*medium spiny neurons*) du striatum reçoivent des afférences de populations corticales. Ces populations corticales génèrent des oscillations à des fréquences variables et l'intégration de l'ensemble des phases de ces oscillateurs par les neurones épineux du striatum donne une image représentative du temps (voir Figure 25). Pour que cette phase soit toujours la même pour un même intervalle d'intérêt, il faut que les oscillateurs du cortex soient synchronisés au début de l'intervalle à mesurer (Kononowicz 2015), une fonction qui serait médiée par la dopamine. Des données récentes chez le rat appuient ce modèle et montrent que le cortex frontal présente effectivement une augmentation de l'activité ocillatoire dans la bande thêta (3-8 Hz) au court d'une tâche temporelle, augmentation cohérente avec une synchronisation de ses populations neuronales oscillatrices, et que cette augmentation des oscillations thêta est dépendante de la dopamine (Parker et al. 2014).

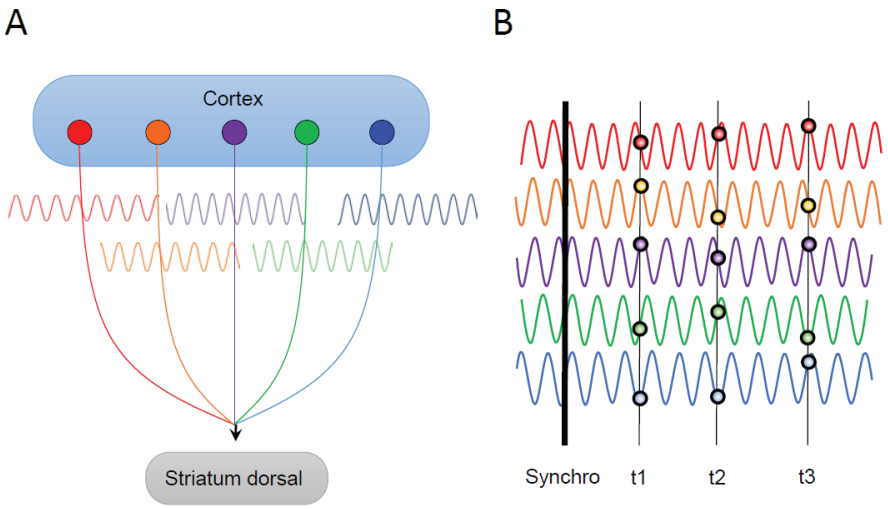


Figure 25 : Schéma explicatif du modèle SBF. A. Des oscillateurs corticaux ayant chacun leur fréquence d'oscillation propre se projettent sur les neurones épineux du striatum dorsal. B. Au début d'un intervalle à mesurer, un signal dopaminergique synchronise la phase des oscillateurs corticaux. La durée de l'intervalle est alors mesurable par « l'image » formée par l'ensemble des phases des oscillateurs et détectée par le striatum dorsal (adapté de Buhusi and Meck 2005).

b. L'amygdale

Un nombre croissant d'études suggèrent que d'autres structures auraient également une importance cruciale dans la mémoire temporelle. L'amygdale par exemple, serait particulièrement importante pour la mémorisation d'intervalles de temps dans un conditionnement associatif. En effet, des études d'imagerie ou d'enregistrement unitaire ou multi-unitaire montrent une augmentation d'activité de l'amygdale juste avant l'arrivée du SI. Par ailleurs, l'amygdale s'active également lorsque le SI est omis ou que des irrégularités temporelles sont détectées (pour revue, voir Díaz-Mataix et al. 2014). De plus, Díaz-Mataix et al (2013) ont fait l'expérience suivante : ils ont soumis des rats à un conditionnement de peur au son avec un certain intervalle SC-SI. Ces rats ont consolidé ce premier apprentissage et il leur a ensuite été présenté un nouvel intervalle SC-SI. Les auteurs ont montré que les rats étaient capables de détecter la différence entre le premier et le second intervalle : la présentation du deuxième intervalle est suffisante pour induire une reconsolidation de la trace mnésique, soit une période de labilité de la trace pendant laquelle elle peut être mise à jour, et l'injection d'un bloqueur de synthèse protéique dans l'amygdale bloque cette reconsolidation, endommageant la trace mnésique. Ces données montrent que la reconsolidation d'une mémoire de peur suite à la modification de l'intervalle SC-SI dépend de la synthèse protéique dans l'amygdale.

Ce rôle de l'amygdale impliquerait également une modulation dopaminergique. En effet, l'injection d'antagoniste dopaminergique dans l'amygdale empêche également l'expression d'un comportement temporel dans un conditionnement de peur à l'odeur (Shionoya et al. 2013) et la lésion de l'amygdale ou de la communication entre l'amygdale et les afférences dopaminergiques du striatum dorsal ont un effet délétère sur la précision de l'estimation temporelle (Es-seddiqi et al. 2016).

c. L'hippocampe

L'hippocampe semble également impliqué dans la mémoriation d'intervalles de temps. Par exemple, Deshmukh et Bhalla (2003) ont enregistré des neurones hippocampiques lorsque des rats étaient soumis au protocole suivant : des odeurs de 10 s sont présentées successivement, avec des intervalles inter-odeurs de 20, 30, 60, 110 ou 160 s. Les auteurs montrent ainsi que les neurones hippocampiques répondent à la présentation d'odorants mais que cette réponse est sensible à l'intervalle inter-odeur : leur réponse est dépendante de l'intervalle inter-odeur précédent, chaque neurone ne répondant qu'après 3 intervalles au maximum. Ces données suggérent que l'hippocampe peut garder une trace du temps écoulé entre 2 stimuli (Deshmukh and Bhalla 2003). Cette hypothèse a été confirmée par le travail des laboratoires de György Buzsáki et d'Howard Eichenbaum qui ont montré l'existence de « *time cells* » dans l'hippocampe, des neurones qui déchargent de manière séquentielle au cours d'intervalles à encoder. Ces laboratoires ont utilisé des méthodes différentes mais ont tous les deux montré l'existence d'ensembles de neurones hippocampiques activés lorsque le rat est soumis à un délai d'attente et cette activation n'est pas liée à la position du rat dans l'espace ni aux mouvements de son corps mais exclusivement au moment dans l'attente. Ainsi, dans une attente de 10 s, un premier neurone déchargera systématiquement à 2 s alors qu'un autre déchargera toujours à 8 s (Pastalkova et al. 2008; MacDonald et al. 2011, 2013). De plus, dans une tache de PI, la lésion de l'hippocampe dorsal modifie le temps d'occurrence du pic de réponse conditionnée et augmente son coefficient de variation, suggérant que l'hippocampe dorsal est bien important pour la justesse et la précision de l'estimation temporelle (Tam et al. 2015).

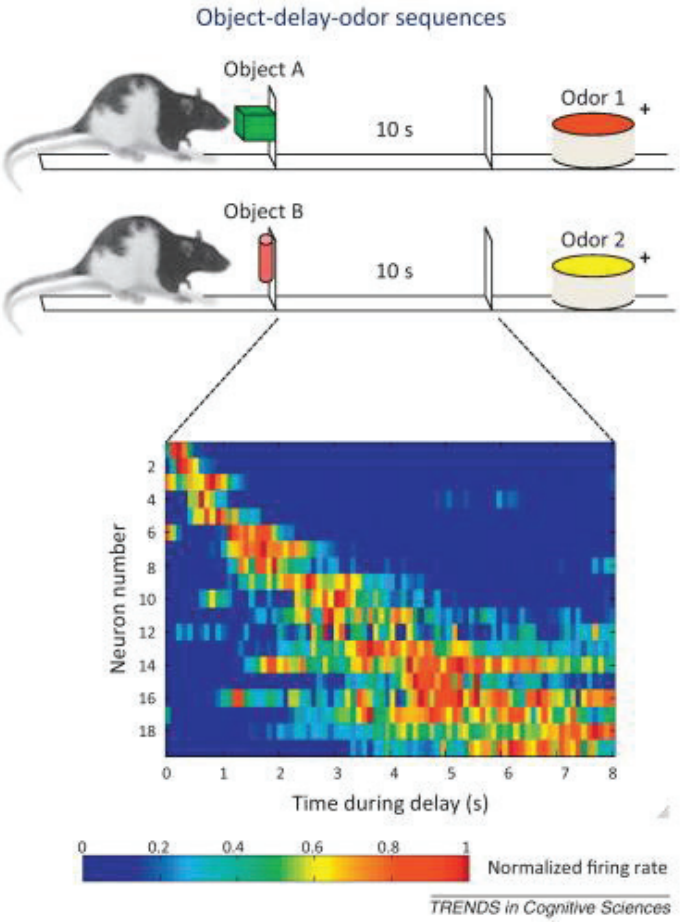


Figure 26 : Tâche d'appariement objet-odeur retardé. Le rat doit associer un objet à une odeur pour accéder à une récompense. Entre la présentation de l'objet et celle de l'odeur, il est soumis à un délai d'attente pendant lequel des neurones hippocampiques s'activent de manière séquentielle. Ces neurones sont appelés « time cells ». (Eichenbaum 2013)

d. Les aires sensorielles

Enfin, nous avons jusqu'ici présenté un ensemble de structures qui seraient impliquées dans la perception et la mémorisation temporelle de manière centralisée, pour de nombreuses tâches appréhendées par différentes modalités sensorielles. Toutefois, un nombre croissant d'auteurs proposent des modèles distribués de la perception temporelle, dans lesquels un ensemble de mécanismes distribués dans le cerveau permettraient l'estimation temporelle. L'engagement d'un mécanisme particulier dépendrait de la tâche et de la modalité sensorielle impliquée (Merchant et al. 2013). Un ensemble de données suggère en particulier que les aires sensorielles elles-mêmes seraient impliquées dans la mémorisation des intervalles de temps (pour une discussion, voir Bueti 2011). La manière dont le temps serait encodé dans ces aires sensorielles est encore largement spéculative.

Dans le système olfactif en particulier, des activations corrélées aux régularités temporelles des paradigmes d'études ou à une caractéristique temporelle du stimulus lui-même ont été montrées. Ainsi, un sous-ensemble de neurones olfactifs des antennes des homards présentent une activité en saccades en réponse aux odeurs et sont capables d'encoder les propriétés temporelles des odeurs intermittentes qui leurs sont présentées (Park et al. 2014). Un encodage du temps a également été démontré dans le bulbe olfactif de souris : Li et al (2014) ont activé les neurorécepteurs olfactifs de souris pendant des durées précises en utilisant une technique d'optogénétique et ont constaté que certaines cellules mitrales et à panache étaient activées de manière tonique pendant l'ensemble de cette stimulation, transmettant ainsi la dimension temporelle du stimulus aux aires sensorielles corticales. Enfin, toujours dans le cas du système olfactif, Hegoburu et al (2009) ont montré que dans

un conditionnement de peur à l'odeur utilisant un intervalle inter-essai fixe de 4 min le cortex piriforme postérieur présentait une augmentation de la concentration de glutamate et de GABA lors de chaque association odeur-choc et que ces augmentations cycliques toutes les 4 min perduraient dans les minutes suivant la fin du conditionnement, suggérant un encodage de la durée de l'intervalle inter essai au sein du cortex piriforme.

Par conséquent, les systèmes sensoriels eux-mêmes semblent participer à l'encodage des intervalles de temps et les durées des stimuli qui sont présentés à l'animal.

II. L'estimation de la durée de l'odeur dans un conditionnement odeur – choc chez le rat adulte

Dans le cadre d'un conditionnement de peur à l'odeur, le rat encode la durée entre l'arrivée de l'odeur et le choc après très peu de présentations de l'association odeur-choc. Cette démonstration a été faite pour la première fois dans notre équipe, juste avant le début de ma thèse (Shionoya et al. 2013). C'est sur ces résultats et en utilisant une méthode similaire que la première étude de ma thèse s'est fondée. Je vais les détailler un peu ici.

1. Méthodes

Comme précisé au chapitre 4, mesurer plusieurs réponses de peur en parallèle permet d'avoir une estimation plus précise de l'apprentissage. Dans le cadre de l'étude présentée ici, pour étudier la mémoire temporelle d'un intervalle de 20 à 30 s, il était nécessaire d'utiliser des mesures fines du comportement, qui donnent un accès à l'état émotionnel du rat second par seconde. Par ailleurs, ces mesures devaient être réalisables au cours de la séance d'acquisition du conditionnement, afin de permettre de visualiser la mise en place d'un comportement temporel par une approche non-invasive.

Les paramètres choisis ont été le freezing, mesure très classique de la peur, la respiration, qui est à la fois importante pour l'olfaction et influencée par l'état émotionnel du rat et les vocalisations ultrasoniques qui sont un reflet direct de l'état émotionnel de l'animal. Pour enregistrer ces paramètres, une cage expérimentale a été imaginée et réalisée à l'aide de l'équipe technique du laboratoire (voir Figure 27) : la cage principale est un pléthysmographe de la société Emka Technologies placé dans une enceinte insonorisée et auquel a été ajouté un plancher électrifiable. Le plafond de la cage est également équipé d'une tour dans laquelle sont introduits des tubes pour l'arrivée de l'odeur et un microphone Avisoft-Bioacoustics pour l'enregistrement des ultrasons. L'air est constamment renouvelé à l'aide d'une pompe aspirant l'air odorisé par le bas de la cage. Aux quatre coins de l'enceinte d'insonorisation sont installées des caméras permettant une détection fine des mouvements du rat.

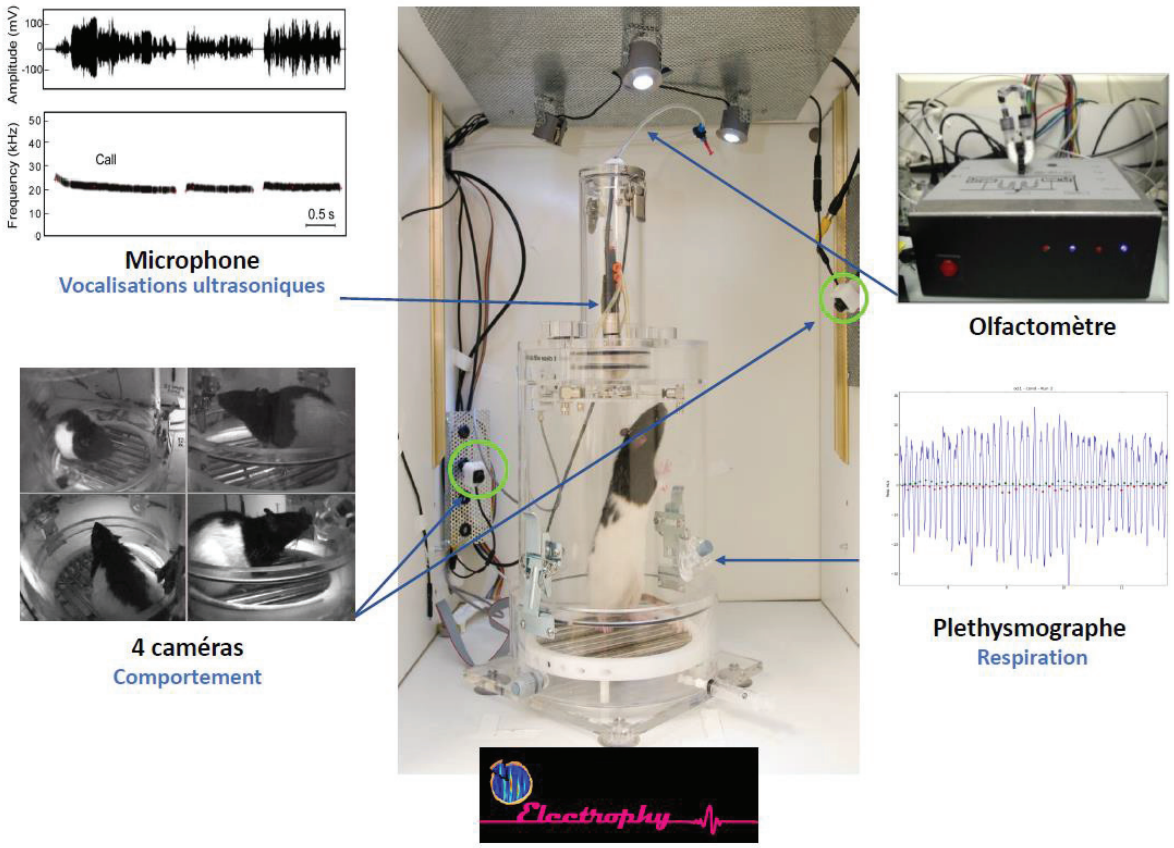


Figure 27 : Schéma du dispositif expérimental. La cage expérimentale est constituée d'un pléthysmographe enregistrant la respiration du rat, et dont le plancher est électrifiable. Dans le haut du pléthysmographe des tubes permettent de délivrer une odeur, et un microphone a été introduit pour enregistrer les vocalisations ultrasoniques. Quatre caméras enregistrent le comportement du rat tout au long de la session. L'ensemble du protocole et l'infusion des odeurs est piloté par ordinateur puis les données sont synchronisées dans la base de données OpenElectrophy (adapté de Hegoburu et al. 2011).

Le protocole de conditionnement de peur à l'odeur est administré par un logiciel qui permet de programmer l'envoi d'odeurs via un olfactomètre couplé à la distribution d'un choc électrique après un intervalle constant via un stimulateur (Shocker Coulbourn). L'ensemble a été développé par Belkacem Messaoudi. La respiration est détectée par le pléthysmographe, amplifiée et enregistrée par un logiciel (Neurolabscope) développé par Samuel Garcia, les cycles respiratoires étant détectés *a posteriori*. Le comportement du rat est enregistré par un logiciel (Volcan) développé au laboratoire par Marc Thévenet qui permet également *a posteriori* l'encodage du comportement du rat. Les vocalisations sont enregistrées et détectées *a posteriori* par des logiciels développés par Avisoft-Bioacoustics.

L'ensemble des paramètres enregistrés sont ensuite introduits dans une base de données (OpenElectrophy), développée au laboratoire par Samuel Garcia et Nicolas Fourcaud-Trocmé (Garcia and Fourcaud-Trocmé 2009), où ils sont synchronisés entre eux et avec l'arrivée de l'odeur et du choc. Les analyses sont ensuite réalisées grâce à des scripts écrits en Python. Pour plus de détails sur la cage et les méthodes d'analyse utilisées pour les différents paramètres, se référer à Hegoburu et al (2011).

Pour étudier la capacité des rats à mémoriser un intervalle temporel, les animaux sont soumis à un premier conditionnement odeur-choc utilisant un intervalle de 20 s, puis reconditionnés en utilisant un intervalle de 30 s. Le décours temporel de la réponse de peur entre le début de l'odeur et

l'arrivée du choc est analysée et comparée pendant les deux sessions de conditionnement, permettant de mesurer si les animaux adaptent leur réponse comportementale à la durée de l'intervalle.

Le protocole expérimental utilisé pour les conditionnements à 20 et 30 s consiste en 10 associations odeur-choc utilisant une odeur de menthe comme odeur conditionnée et un choc électrique modéré (0,4 mA, 1 s) comme stimulus inconditionné, 4 min séparant chaque présentation odeur-choc (Figure 28A et C). La mémoire associative est testée 24h après le premier conditionnement par 5 présentations de l'odeur seule (Figure 28B).

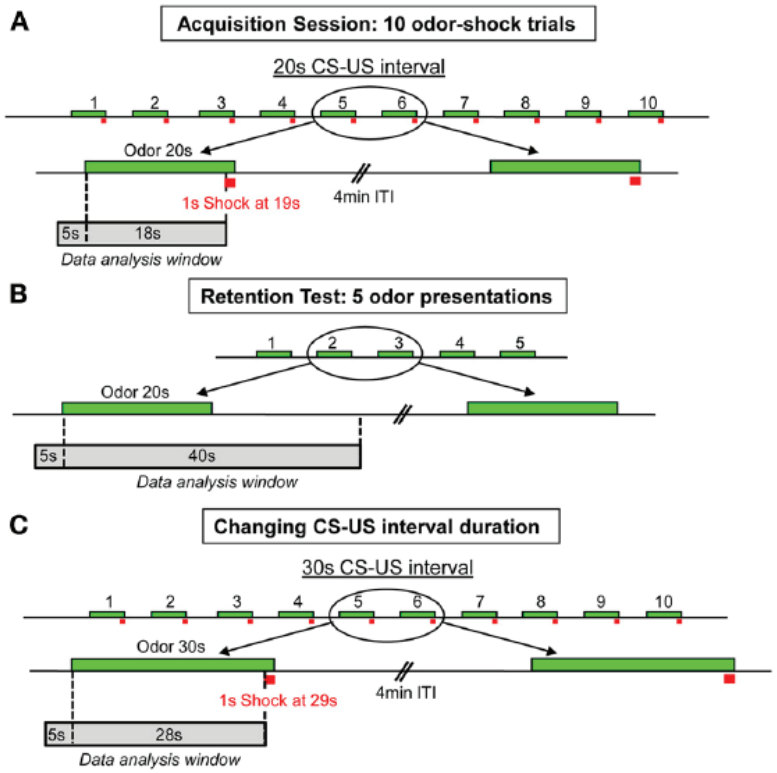


Figure 28 : Paradigme utilisé dans l'étude de Shionoya et al (2013), schéma issu de leur article.

2. Résultats

L'étude confirme que le paradigme et les méthodes utilisés permettent bien un conditionnement de peur à l'odeur chez le rat adule. En effet, lorsque les rats sont placés dans un contexte modifié 24h plus tard, la présentation de l'odeur conditionnée entraine une augmentation du freezing de l'animal (Figure 29).

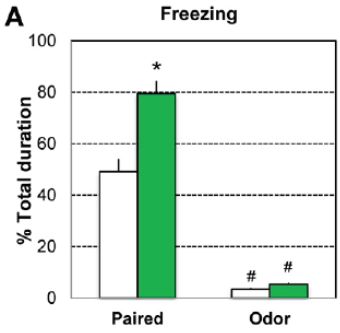


Figure 29 : Pourcentage de freezing observé au cours de la session de rétention, avant (blanc) et pendant (vert) la présentation de l'odeur conditionnée, chez des rats ayant subi un conditionnement odeur-choc (Paired) ou auxquels l'odeur a été présentée seule (Odor) (extrait de Shionoya et al. 2013).

Par ailleurs, au cours du conditionnement le freezing, la respiration et les USV adoptent un décours temporel anticipatoire caractéristique avec une augmentation du freezing et des USV et une diminution de la respiration juste avant le choc à 20 s. Lorsque l'intervalle entre l'arrivée de l'odeur et le choc est allongé, ces motifs caractéristiques sont décalés en anticipation de la nouvelle occurrence du choc (Figure 30).

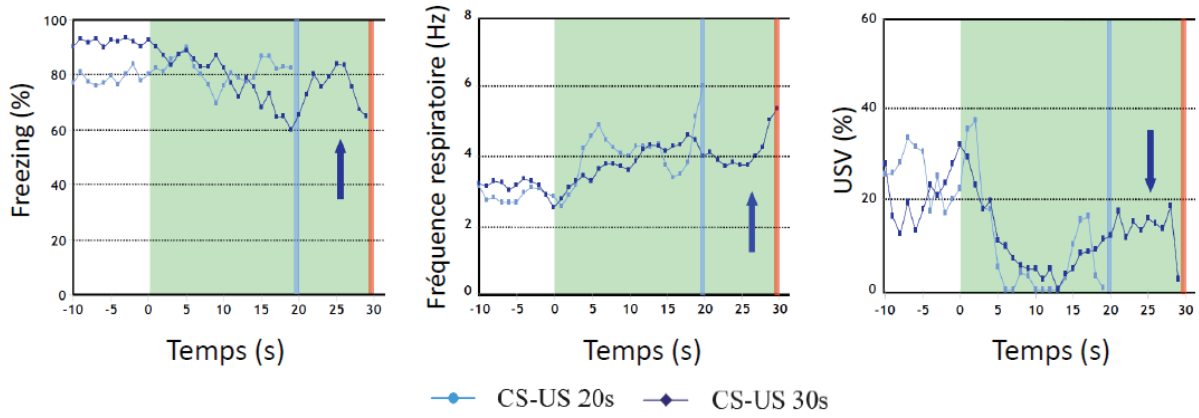


Figure 30 : Effet du conditionnement de peur à l'odeur utilisant un intervalle de 20 s (bleu clair) et d'un reconditionnement utilisant un intervalle de 30 s (bleu foncé) sur le freezing, la fréquence respiratoire et l'émission de vocalisations ultrasoniques. La présentation de l'odeur est indiquée par le cadre vert et le choc par la ligne rouge. Les flèches indiquent les motifs se produisant avant le choc à 20 s et qui ont été déplacés vers 30 s par le changement de durée (adapté de Shionoya et al. 2013).

La largeur des motifs est également modifiée par le changement de durée de l'intervalle. Par exemple, sur la respiration, on peut voir que le motif en U observé juste avant le choc est plus large lorsque le choc est attendu à 30 s que lorsqu'il est attendu à 20 s. Cette caractéristique rappelle la propriété scalaire des comportements temporels. Afin de tester cela, les auteurs ont changé les abscisses des courbes et ont mesuré dans quel cas les courbes en réponse à un intervalle de 20 et de 30 s se superposaient le mieux (voir Figure 31). Ils ont en particulier transformé les courbes de manière multiplicative, soit proportionnellement à la durée à encoder, ou de manière additive, c'est-à-dire en alignant les courbes sur le temps du choc plutôt que sur le temps de l'arrivée de l'odeur.

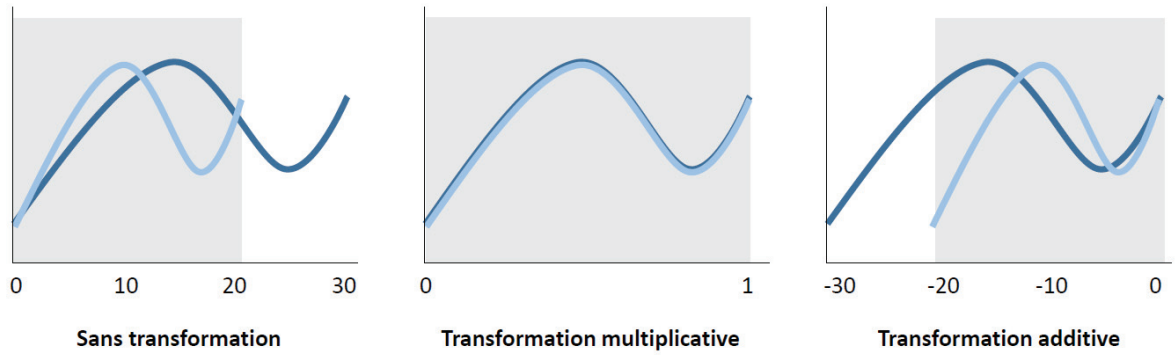


Figure 31 : Schéma explicatif des transformations utilisées pour tester le respect de la propriété scalaire. En gris la zone sur laquelle la superposition des courbes est mesurée.

Ils ont ainsi pu montrer que les courbes de la respiration et du freezing se superposaient mieux lorsqu'elles étaient transformées de manière multiplicative que lorsqu'elles n'étaient pas transformées ou transformées de manière additive. Cela suggère que la respiration et le freezing respectent la propriété scalaire. Au contraire, la superposition des courbes des USV n'est pas améliorée par la transformation multiplicative, suggérant que cette mesure n'est pas une bonne mesure de la mémoire temporelle de l'odeur (voir tableau 2).

Tableau 2 : Coefficients de superposition mesurés sans transformation, avec une transformation multiplicative ou additive pour le freezing, la respiration et les USV. Les nombres en gras sont les coefficients les plus élevés pour la mesure qui montrent la transformation qui permet la plus grande superposition des courbes

	Sans transformation	Transfo. multiplicative	Transfo. additive
Freezing	0,45	**0,59**	0,36
Respiration	0,59	**0,76**	0,60
USV	**0,92**	0,83	0,27

Cette étude a permis de montrer pour la première fois que des rats étaient capables d'encoder la durée de l'intervalle entre l'arrivée de l'odeur et celle du choc dans un conditionnement de peur à l'odeur, que cet apprentissage de la durée était réalisé en quelques présentations odeur-choc seulement et que la respiration et le freezing respectaient la propriété scalaire. Ces deux paramètres sont donc de bonnes mesures pour étudier la mémoire temporelle dans un conditionnement de peur à l'odeur chez le rat.

Publication 1

***Objectif de la première étude de thèse** : Dans le conditionnement de peur à l'odeur, le rat apprend non seulement le fait que l'odeur prédit qu'un choc va arriver mais également quand il va arriver. La capacité du raton à percevoir cette deuxième information est encore très largement inconnue. La première étude de cette thèse vise à comprendre dans quelle mesure le raton est capable de percevoir la durée de l'intervalle qui sépare le début de l'odeur et l'arrivée du choc et d'adapter sa réponse de peur au stimulus en fonction de cette perception temporelle. Par ailleurs, nous avons mentionné dans l'introduction que le striatum serait crucial à la perception temporelle. Nous avons donc étudié dans quelle mesure il est activé dans le conditionnement de peur à l'odeur chez le rat adulte et chez le raton.*

Cette étude a été menée en collaboration avec le laboratoire de Regina Sullivan pour la mesure de l'activation du striatum dans le conditionnement de peur à l'odeur chez le rat adulte et le raton. Pour cette partie du travail, j'ai eu l'opportunité d'être accueillie dans son laboratoire à New-York. Le projet a également été réalisé en collaboration avec Valérie Doyère et Bruce Brown pour leur expertise sur la mémoire temporelle, Chloé Hegoburu qui a initié le projet à Lyon et Juliette Rousselot qui a continué l'acquisition des données et leur traitement entre mon stage de M1 et le début de ma thèse. Ces collaborations ont été facilitées par un financement du Partner University Fund, obtenu par Valérie Doyère et Regina Sullivan.

Suite à l'étude publiée par Shionoya et al. (2013), et considérant le fait que la plupart des structures traditionnellement impliquées dans la mémoire temporelle sont immatures chez le raton, nous avons voulu tester si ceux-ci étaient capables de mémoriser l'intervalle odeur-choc.

Pour ce faire, nous avons dû adapter la cage, démarche initiée par Chloé Hegoburu que j'ai continuée pendant mon master. J'ai également été l'initiatrice d'une automatisation du codage du comportement : l'ancien codage était entièrement manuel via un clavier éthologique et réalisé en une fois en continu en visionnant les vidéos, ce qui demandait énormément de temps et entraînait des erreurs dues à la fatigue de l'expérimentateur. Marc Thévenet (pour le développement) et moi-même (pour le débuggage, déterminer les paramètres de détection à utiliser aux différents âges et pour les demandes d'améliorations) avons adapté le logiciel Volcan pour permettre un encodage semi-automatique du mouvement (voir validation en annexe 2).

Nous avons ensuite conditionné des ratons de PN12-15 et des rats adultes en utilisant un conditionnement de peur à l'odeur identique à celui utilisé par Shionoya et al (2013). Nous avons tout d'abord confirmé que les ratons exprimaient bien une réponse de peur à l'odeur à la suite d'un tel conditionnement. Nous avons ensuite mesuré l'activation du striatum par le conditionnement chez des ratons avant sevrage et des rats adultes en utilisant une technique d'autoradiographie au 2-DG permettant de marquer les structures activées pendant le conditionnement de peur à l'odeur. Cette expérience a montré que le striatum est activé par le conditionnement de peur à l'odeur chez le rat adulte mais n'est pas encore recruté par le conditionnement chez les ratons. Enfin, nous avons comparé les décours temporels de la respiration et du freezing au cours d'un conditionnement odeur-choc utilisant un intervalle de 20 s ou 30 s. Cette étude a permis de montrer que les ratons apprenant un intervalle de 20 s avaient un décours temporel de la respiration et du freezing différent de ceux apprenant un intervalle de 30 s. Chez les ratons, comme chez les adultes, la réponse respiratoire et de freezing au cours de la présentation de l'odeur respectent la propriété scalaire.

L'ensemble de ces données montre que les ratons sont capables de mémoriser un intervalle odeur-choc dès PN12-15, soit avant que le striatum soit activé par le conditionnement de peur à l'odeur.

Comparaison avec l'étude de Shionoya et al (2013) : dans notre étude, nous n'avons pas utilisé les vocalisations pour mesurer le décours temporel de la réponse émotionnelle car l'étude chez l'adulte avait montré qu'elles ne respectaient pas la propriété scalaire, suggérant qu'elles n'étaient pas un bon paramètre pour étudier la mémoire temporelle. Par ailleurs, contrairement à l'étude précédente qui avait conditionné les animaux aux deux intervalles de façon successive (20 s puis 30 s), nous avons choisi de conditionner les animaux à l'un ou l'autre intervalle. Nous avions donc 2 groupes d'animaux, un groupe apprenant un intervalle de 20 s, l'autre un intervalle de 30 s. Cela présente l'avantage de ne pas biaiser le comportement temporel exprimé en réponse au deuxième intervalle par la mémoire du premier. Les résultats obtenus montrent que la respiration est une mesure plus adaptée que le freezing pour étudier la mémoire temporelle chez le rat dans un conditionnement de peur à l'odeur.

Cette étude a donné lieu à la publication suivante :

Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers JL, Londen E, Rousselot J, Szyba K, Thévenet M, Sullivan-Wilson TA, Doyère V, Sullivan RM, et Mouly A-M 2014. Infant rats can learn time intervals before the maturation of the striatum: evidence from odor fear conditioning. Front Behav Neurosci ***8****: 176*

frontiers in
BEHAVIORAL NEUROSCIENCE

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE
published: 15 May 2014
doi: 10.3389/fnbeh.2014.00176

Infant rats can learn time intervals before the maturation of the striatum: evidence from odor fear conditioning

Julie Boulanger Bertolus[1]*, Chloe Hegoburu[1], Jessica L. Ahers[2], Elizabeth Londen[2], Juliette Rousselot[1], Karina Szyba[2], Marc Thévenet[1], Tristan A. Sullivan-Wilson[2], Valérie Doyère[3], Regina M. Sullivan[2] and Anne-Marie Mouly[1]

[1] *Lyon Neuroscience Research Center, INSERM U1028, CNRS UMR5292, University Lyon1, Lyon, France*
[2] *Child and Adolescent Psychiatry, Emotional Brain Institute, Nathan Kline Institute, New York University School of Medicine, New York, NY, USA*
[3] *Centre de Neurosciences Paris-Sud, CNRS UMR 8195, University Paris-Sud, Orsay, France*

Edited by:
Carmen Sandi, Ecole Polytechnique Federale De Lausanne, Switzerland

Reviewed by:
Daniel W. Wesson, Case Western Reserve University, USA
Antonios Stamatakis, National and Kapodistrian University of Athens, Greece

***Correspondence:**
Julie Boulanger Bertolus and Anne-Marie Mouly, CRNL, UMR 5292, INSERM 1028, Université Lyon1, 50 Avenue Tony Garnier, 69633 Lyon Cedex 7, France
e-mail: julie.boulanger-bertolus@olfac.univ-lyon1.fr; ammouly@olfac.univ-lyon1.fr

Interval timing refers to the ability to perceive, estimate and discriminate durations in the range of seconds to minutes. Very little is currently known about the ontogeny of interval timing throughout development. On the other hand, even though the neural circuit sustaining interval timing is a matter of debate, the striatum has been suggested to be an important component of the system and its maturation occurs around the third post-natal (PN) week in rats. The global aim of the present study was to investigate interval timing abilities at an age for which striatum is not yet mature. We used odor fear conditioning, as it can be applied to very young animals. In odor fear conditioning, an odor is presented to the animal and a mild footshock is delivered after a fixed interval. Adult rats have been shown to learn the temporal relationships between the odor and the shock after a few associations. The first aim of the present study was to assess the activity of the striatum during odor fear conditioning using 2-Deoxyglucose autoradiography during development in rats. The data showed that although fear learning was displayed at all tested ages, activation of the striatum was observed in adults but not in juvenile animals. Next, we assessed the presence of evidence of interval timing in ages before and after the inclusion of the striatum into the fear conditioning circuit. We used an experimental setup allowing the simultaneous recording of freezing and respiration that have been demonstrated to be sensitive to interval timing in adult rats. This enabled the detection of duration-related temporal patterns for freezing and/or respiration curves in infants as young as 12 days PN during odor fear conditioning. This suggests that infants are able to encode time durations as well as and as quickly as adults while their striatum is not yet functional. Alternative networks possibly sustaining interval timing in infant rats are discussed.

Keywords: olfactory fear conditioning, ontogeny, memory, interval timing, striatum, respiration, freezing, infant rats

INTRODUCTION

The ability to time events is continuously used in humans and other animals. It leads to the prediction of events, to the production of appropriate responses, and to the detection of errors in usual temporal patterns. It allows us, for example, to estimate if we have time to cross the street or if we have to stop when the traffic light turns yellow by estimating when it will turn red. Pavlov (1927) was the first to describe the encoding of the temporal relationships between events. Pavlovian conditioning is now defined as the pairing of an initially neutral stimulus (the conditioned stimulus, CS) with an unconditioned one (US). After repeated presentations of this association, the CS elicits conditioned responses which appear to be anticipatory to the arrival of the US (Pavlov, 1927). This suggests an encoding of the temporal relationships between the CS and the US.

The ability to perceive, estimate and discriminate durations in the range of seconds to minutes is referred to as interval timing. Very little is currently known about the ontogeny of interval timing throughout development. Fitzgerald et al. (1967) demonstrated that human infants as young as 1-month-old can be conditioned to temporal regularities. Indeed, when exposed to repeated light/dark switches, they exhibit pupillary dilatation, which becomes regular regardless if the light stimulus is presented or not. Since then, several studies have compared time judgments during development and showed that time estimation improves throughout childhood (see a meta-analysis by Block et al., 1999; a review by Droit-Volet, 2011). In animals, most of the studies carried out to investigate the ontogeny of time encoding in rats have used eyeblink conditioning, which involves interval durations in the milliseconds range. This procedure usually consists of pairing an auditory stimulus with an eyeblink-eliciting US (e.g., a mild air-puff to the eye or a mild shock to the eyelid). After many CS-US pairings (usually 100–300), a conditioned eyeblink response occurs such that the peak amplitude of the conditioned response occurs at or just before the onset time of the

US (Smith, 1968; Smith et al., 1969). Eyeblink conditioning has been shown to emerge gradually between post-natal (PN) day 17 and PN24 (Stanton et al., 1992; Freeman et al., 1993). However, while interstimulus interval discrimination of the conditioned eyeblink response occurs in juvenile rats, performance shows protracted development through adulthood (Freeman et al., 2003; Brown et al., 2006). Concerning the timing of longer duration intervals (seconds to minutes range), only two studies (Lejeune et al., 1986; Lejeune, 1992) investigated interval timing in juvenile (20–30 days of age) rats using a Fixed Interval procedure, where a food reinforcer was delivered in response to lever presses on a fixed 60 s schedule. This procedure is used to investigate the ability of animals to adjust to the temporal regularities of their environment. The studies by Lejeune et al. (1986) and Lejeune (1992) reported excellent temporal regulation of behavior in juvenile rats. However, since Fixed Interval procedures require multiple training days, juvenile rats reached the age of 30 days at the end of training. To our knowledge, no experiment has been conducted to test interval timing at younger ages in rats.

The neural circuits sustaining the encoding and memorization of temporal information are still a matter of debate. Numerous structures have been suggested to be involved, with considerable differences depending on the paradigms, and no structure has been exclusively related to time encoding. Yet, there is a consensus in the literature that the areas critically involved in timing depend on the timescale considered. Indeed, the cerebellum might be crucial for sub-second durations, while the striatum and prefrontal cortex might be more involved in processing seconds to minutes interval durations (for reviews, see Buhusi and Meck, 2005; Meck et al., 2008). More specifically, a number of recent studies have demonstrated that the striatum is an important component of the interval timing system both in humans and animals (reviewed in Buhusi and Meck, 2005; Coull et al., 2011). However, anatomical studies showed that the striatum morphological maturation occurs around PN15 (Chronister et al., 1976; Tepper and Trent, 1993). Moreover, Tepper et al. (1998) reported that the electrophysiological characteristics of the striatal neurons continue to mature throughout the preweaning period. This delayed ontogenesis of the striatum raises the question of whether rats are capable of timing intervals prior to striatum development. The global aim of the present study was to investigate interval timing abilities in rats at an age for which the striatum was not yet mature.

We addressed this question using odor fear conditioning. Indeed, in comparison with the Fixed Interval procedure, fear conditioning makes very little demand on the rat motoric capabilities. Furthermore, odor fear conditioning can be applied to very young animals (Sullivan et al., 2000) as their sense of smell is fully functional at birth, contrary to vision and audition.

We first investigated whether the striatum, known for its role in time processing, was activated by odor fear conditioning in developing rats using 2-DG autoradiography. Although fear learning was shown at all tested ages, activation of the striatum was observed in adults but not in juvenile animals. Next, we assessed the presence of evidence of interval timing in ages before and after the inclusion of the striatum into the fear conditioning circuit. For this, we used an experimental setup allowing the simultaneous recording of freezing and respiration which have been demonstrated to be sensitive to interval timing in adult rats (Hegoburu et al., 2011; Shionoya et al., 2013). This enabled us to assess the emergence of temporal patterns during the acquisition of the odor-shock association in both adult and infant rats. Such analysis revealed evidence of interval timing in ages prior to and after the functional maturation of the striatum.

METHODS

ANIMALS

The subjects were male and female Long Evans rats born and bred either in the Nathan Kline Institute colony (originally from Harlan, USA) or in the Lyon Neuroscience Research Center (originally from Janvier, France). Only one female and one male pup per litter per treatment/test condition were used for all experiments and animals from the same litters were used in the different treatment/test conditions and ages. A total of 20 litters were used. Three groups of ages were used: PN day 12–15 (PN12–15, infants), PN22–24 (juveniles) and older than PN75 (adults). Day of birth was considered PN0. Pups were maintained with their litters up to the end of the experiments, including juvenile pups. Adults were housed by pairs at 23°C and maintained under a 12 h light-dark cycle (lights on from 6:00 am to 6:00 pm). Food and water were available *ad libitum* and abundance of wood shavings was supplied for nest building. All experiments were conducted in strict accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee of the Nathan Kline Institute, which follows the guidelines from the American National Institutes of Health, and with the European Community Council Directive of November 24, 1984 (84/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for care and use of laboratory animals. Care was taken at all stages to minimize stress and discomfort to the animals. An overlap in personnel conditioning/testing both infant and adult rats in France and the USA ensured consistency of conditioning and testing of infant and adult animals between labs.

TRAINING APPARATUS

Equivalent conditioning apparatus and procedures were used between labs as previously described (USA: Coulbourn equipment, described in Sevelinges et al., 2008; France: Emka and Coulbourn equipment, described in Hegoburu et al., 2011). In the USA, a standard Coulbourn shock chamber was used. In France, a custom built Plexiglas conditioning chamber for fear conditioning was used and equipped with features allowing fine-grain freezing analysis (4 camera views, B/W CMOS PINHOLE camera, Velleman, Belgium, and an homemade acquisition software using Matrox Imaging Library and acquisition card, Matrox video, UK) and a plethysmograph (diameter 30 cm, Emka Technologies, France) for measuring respiratory frequency (see Hegoburu et al., 2011 for further description of the plethysmograph). The height of the plethysmograph was adapted to the age of the animal in order to optimize the signal-noise ratio, leading to a height of 30 cm for the adults and 16.5 cm for the infants.

ODOR FEAR CONDITIONING PROCEDURE

CS-US parameters were standardized between labs. The American lab used the Coulbourn FreezeFrame software for stimuli delivery control and video recording. The French lab used a custom build program for stimuli delivery and recording. Conditioning took place in a sound attenuation chamber with deodorized air constantly flowing through the cage (2 L/min). The odor CS was a 30-s peppermint odor (McCormick Pure Peppermint; 2 L/min; 1:10 peppermint vapor to air) and was controlled with a solenoid valve that diverted the airflow to the peppermint air stream, thus minimizing pressure change. The 1-s mild electric shock was delivered through a grid floor. In the US, for the youngest pups, the shock was delivered through an electrode to one hind limb. At both sites, adult rats were handled for about 4 days and placed into the conditioning chamber for context habituation. Juveniles received only 1 day of handling and habituation while infants, for which conditioning to context is not yet developed (Raineki et al., 2010), were not handled to minimize distress from separation from the mother.

Three training conditions were used throughout the experiments: Odor-shock pairings (Paired condition), Odor-shock unpaired presentation (Unpaired condition) and Odor-alone presentation (Odor group). In the paired groups, during the first 10 min of the conditioning session, the animals were allowed an adaptation period of free exploration. Then the CS odor was introduced into the cage for 30 s, the last second of which overlapped with the shock. The animals received ten odor-shock trials, with an inter-trial interval of 4 min. In the Unpaired groups, the same procedure was carried out except that the shock and the odor were explicitly unpaired using a fixed long duration (180 s) between the odor onset and the shock arrival. In the Odor groups, the odor was presented alone for 30 s.

RETENTION TEST

A subset of animals at the three ages (Infants: $n = 17$; Juveniles: $n = 22$; Adults: $n = 26$) were tested the day after conditioning for learned fear responses. Testing was done by an experimenter blind to the training conditions.

Infants were tested in a y-maze (start box: 8.5 × 10 × 8 cm; choice arms: 8.5 × 24 × 8 cm), one arm containing the peppermint odor CS (20 μL peppermint on Kim Wipe), and the other containing familiar pine shavings (20 mL clean bedding). Pups were given 5 trials. For each trial, the pup was placed in the start box (5 s), the door to each alley opened and the animals were given 60 s to choose an arm. The number of choices of the arm containing the CS odor was compared between groups using a One-Way ANOVA with the Group as an independent factor.

For adults and juveniles, the rat was placed in a novel experimental cage with new contextual (tactile and visual) cues and allowed a 10-min odor-free period. The CS odor was then presented five times (30 s with a 4-min inter-trial interval) and the animal's freezing response was hand scored by an experimenter blind to the training conditions. The average freezing behavior of a 25 s period preceding odor delivery (Pre-CS period) was compared with the full odor presentation period (CS period) using a Two-Way ANOVA with Group (Paired, Unpaired and Odor) as an independent factor and Period (Pre-CS vs. CS) as a repeated measures factor. Significant ANOVAs were followed by *Post-hoc* Fisher comparisons.

STRIATUM 2-DG AUTORADIOGRAPHY

In the ^{14}C 2-DG autoradiography, the animals (adults: $n = 17$, juveniles: $n = 18$) were injected with 2-DG (20 μCi/100 g) 5 min prior to conditioning (Paired, Unpaired and Odor). Brains were removed immediately after the 45 min of conditioning, frozen in 2-methylbutane (−45°C) and stored at −70°C. Brains were then cut into 20 μm coronal sections (following equilibration to −20°C) and placed in exposure cassettes for 4 days with standards (^{14}C methylmethacrylate standard 10 × 0.02 mCi; American Radiolabeled Chemicals, Inc.), scanned (Epson) and analyzed using NIH Image J Software for quantitative optical densitometry. The dorsal striatum was divided into anterior (Bregma +1.9 mm, Paxinos and Watson, 1986) and posterior dorsal striatum (Bregma +0.1). Within each part, the lateral and medial dorsal striatum were differentiated, as they receive inputs from different parts of the brain (McGeorge and Faull, 1989). Coordinates were adjusted in pups to obtain similar measure locations in both adults and pups. To control for potential differences in section thickness and autoradiograph exposure, 2-DG uptake was measured relative to 2-DG uptake in the corpus callosum that did not vary between conditioning groups (Sullivan and Leon, 1986; Sullivan et al., 2000). For each developmental age, the data from the anterior and posterior parts of the dorsal striatum were analyzed using a Three-Way ANOVA with Group as an independent factor and Anteriority (anterior vs. posterior part) and Laterality (lateral vs. medial part) as repeated measures factors. A One-Way ANOVA was then carried out on the data of each of the four subparts, followed by *post-hoc* Fisher comparisons allowed by the ANOVA results.

ASSESSMENT OF TEMPORAL PATTERNS OF FREEZING AND RESPIRATION DURING ACQUISITION

To assess interval timing during development we used olfactory fear conditioning in PN12–15 infant ($n = 30$) and adult rats ($n = 25$), ages representative of before and after functional striatal development. Three experimental groups of animals per age were trained using either 30 s (Paired 30 s group), or 20 s (Paired 20 s group) Odor-Shock interval duration, or Odor alone presentation (Odor group).

In each experimental group, the time course of respiration and behavior was monitored throughout the acquisition session. Offline, the respiratory signal was analyzed and momentary respiratory frequency was determined. The animal's freezing behavior was automatically detected using a LabView homemade software that had been validated by comparison to hand scoring by an experimenter blind to the rats' condition. Definition of the freezing at the different ages followed the methods defined by Takahashi (1992) and takes into account the immaturity of infants' musculoskeletal system. Instant respiratory frequency and freezing were averaged on a second by second basis, leading to 1-s time bins curves. The resulting individual curves were then averaged among animals of the same experimental group.

The temporal dynamics of the recorded parameters in presence of the CS odor was compared using a Two-Way ANOVA with Group as an independent factor and Time as a repeated measures factor. *Post-hoc* pairwise comparisons were then carried out when allowed by the ANOVA results. In addition in each group, a One-Way ANOVA for repeated measures was carried out to compare each CS-bin (i.e., seconds 1–19 in the Paired 20 s group and seconds 1–29 in the Paired 30 s group) to the averaged parameter value during 25 s prior the odor arrival as a baseline. *Post-hoc* within group comparisons were then carried out when allowed by the ANOVA results. For all the statistical comparisons performed, the significance level was set at 0.05.

In order to assess whether the temporal patterns of freezing and respiratory rate observed for the Paired 20 s and Paired 30 s groups are related to the CS-US interval, we assessed whether they respected the scalar property. Indeed, a remarkable property of interval timing is that the error of time estimation varies linearly with the estimated interval. This is known as the scalar property of time estimation (Gibbon, 1977). As a consequence, when the behavioral temporal response functions are normalized by the criterion time (multiplicative rescaling), they superimpose (reviewed in Matell and Meck, 2000). To test if this property was respected for the freezing and respiratory rate temporal responses, the time axis for the individual curves of the Paired 30 s rats was multiplicatively rescaled so that the 19 bins of time of CS for both groups represented the same proportions of elapsed time from CS onset to shock presentation. The scalar timing rule predicts superior superposition of the functions in relative time (multiplicative transform, comparison of the Paired 20 s average curve to the rescaled Paired 30 s average curve), compared to no rescaling (comparison of the Paired 20 s average curve to bins 1–19 of the Paired 30 s average curve) or rescaling by an additive shift of x-axes (additive transform, comparison of the Paired 20 s average curve to bins 11 to 29 of the Paired 30 s average curve). Superposition was indexed by eta-square (η^2), a measure of the proportion of variance accounted for by the mean of the two functions (Brown et al., 1992). When superposition is perfect, η^2 is at its maximum value of 1. Superposition was assessed on curves obtained with absolute freezing and respiratory rate values as well as with data normalized in relative response rate (maximum minus minimum values) on the Y axis.

RESULTS

FEAR LEARNING: ODOR-SHOCK CONDITIONING PRODUCED LEARNING AT ALL AGES

To assess learning from odor-shock conditioning at all ages, some animals were conditioned and tested for retention approximately 24 h later. As illustrated on **Figure 1**, all paired odor-shock conditioning animals showed learning at testing. Infants tested in a Y-Maze (**Figure 1A**) showed a significant Group effect [$F_{(2,\ 14)} = 13.404$, $p = 0.001$] and *post-hoc* Fisher analysis indicated that the paired groups were significantly different from each of the controls (Paired vs. Unpaired $p = 0.002$; Paired vs. Odor $p < 0.001$). Juvenile and adult rats received a cue test (CS presentations) in a novel context with learning assessed through freezing rate and analyzed with Two-Way ANOVA with repeated measures (Pre-CS vs. CS). Juvenile animals (**Figure 1B**) showed a significant Group × Period interaction [$F_{(2,\ 20)} = 4.234$, $p = 0.029$]. *Post-hoc* analysis evidenced a significant freezing increase during the CS odor in the Paired group ($p = 0.02$) while this increase was not present in the Unpaired and Odor groups ($p > 0.05$). Adult rats (**Figure 1C**) showed a significant Group × Period interaction [$F_{(2,\ 23)} = 6.462$, $p = 0.006$]. In the Paired group, the level of freezing was higher during the CS presentation than during the Pre-CS period ($p < 0.05$), while it remained unchanged in the Unpaired and Odor groups ($p > 0.05$).

Therefore, the training paradigm used in the present study resulted in good memory at the three developmental ages considered.

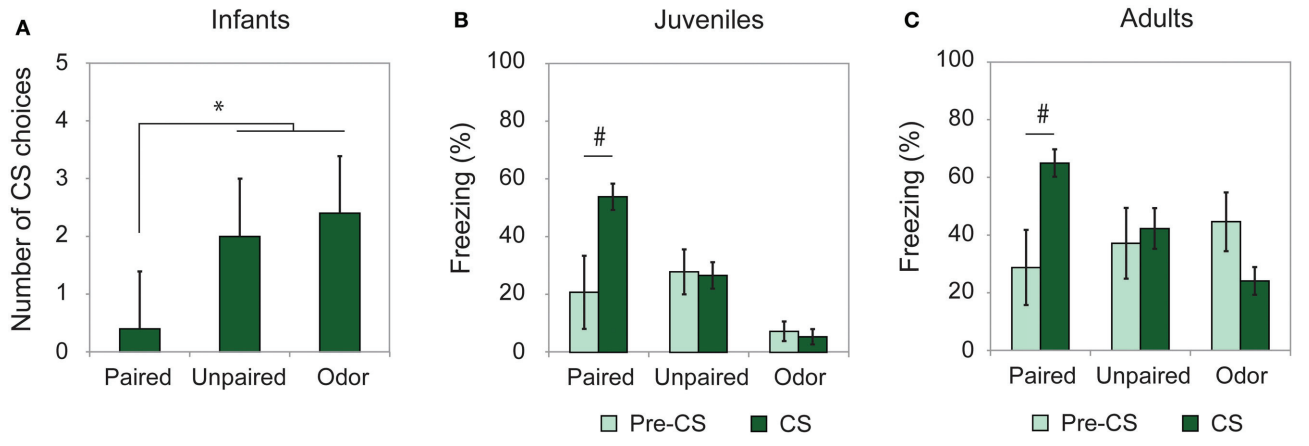


FIGURE 1 | Learning retention session. Animals were tested the day after conditioning. **(A)** Infant rats (Paired, $n = 5$; Unpaired, $n = 6$; Odor, $n = 6$) were given a Y-Maze test and the number of CS choices (mean ± s.e.m.) out of 5 were used as a measure of learning. **(B)** Juveniles (Paired, $n = 7$; Unpaired, $n = 9$; Odor, $n = 6$) and **(C)** adults (Paired, $n = 8$; Unpaired, $n = 8$; Odor, $n = 10$) received a cue test in a novel environment and the freezing rate (mean ± s.e.m.) was compared between pre-CS and CS Odor. #Significant intragroup difference ($p < 0.05$); *significant intergroup difference ($p < 0.05$).

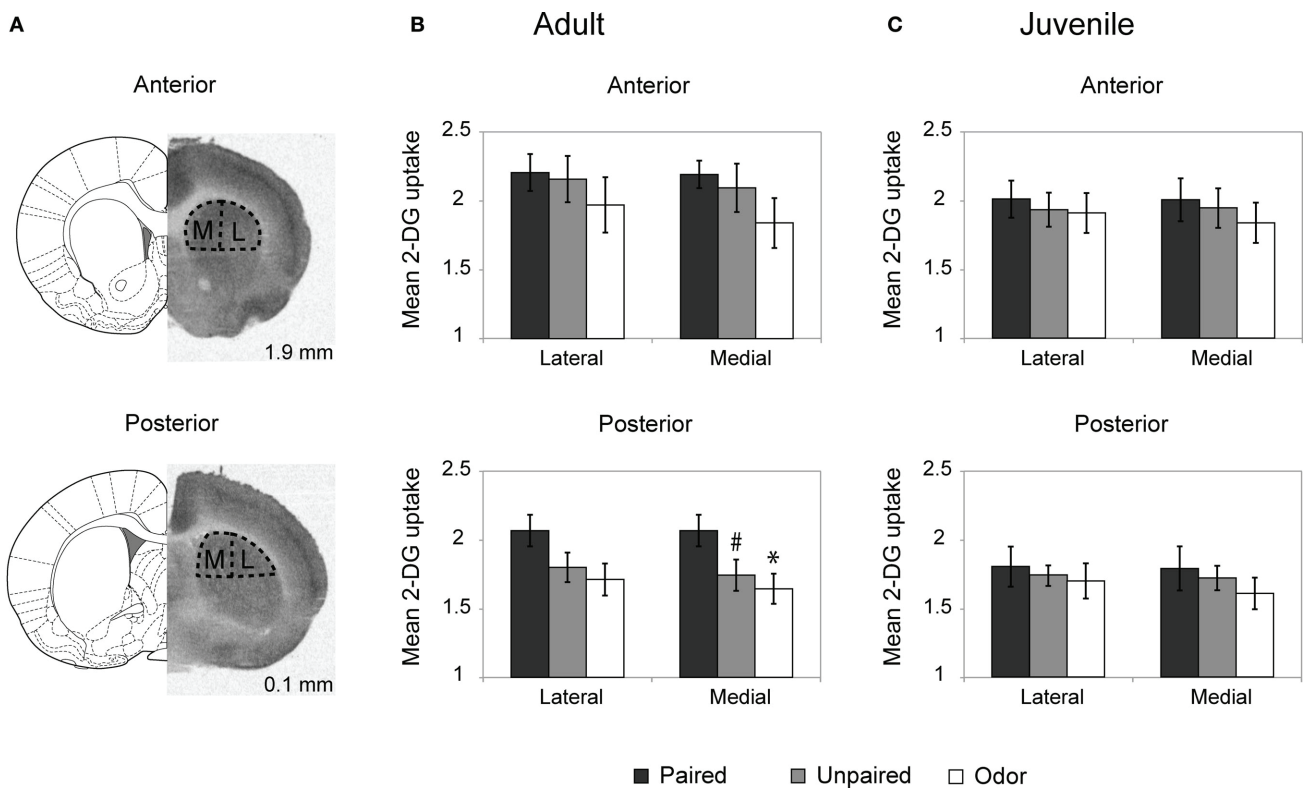


FIGURE 2 | Striatum 2-DG autoradiography during odor fear conditioning. (A) 2-DG autoradiograph with the corresponding coronal brain sections from Paxinos and Watson (1986; numbers on the right indicate distance relative to bregma in mm). Anterior and posterior parts of the dorsal striatum were analyzed separately and subdivided in lateral (L) and medial (M) portions for optical densitometric measurements. **(B,C)** Mean 2-DG uptake ratio (±s.e.m.) in the dorsal striatum relative to corpus callosum during odor fear conditioning in adult **(B)** and juvenile animals **(C)** in the different experimental conditions: Adult Paired ($n = 5$); Adult Unpaired ($n = 6$); Adult Odor ($n = 6$); Juvenile Paired ($n = 6$); Juvenile Unpaired ($n = 6$); Juvenile Odor ($n = 6$). $^{\#}p = 0.066$, $^{*}p = 0.021$, Fisher test comparison with the Paired group.

STRIATAL ^{14}C 2-DG AUTORADIOGRAPHY: THE POSTERIOR DORSAL STRIATUM IS ACTIVATED DURING ODOR-SHOCK CONDITIONING IN ADULTS BUT NOT IN JUVENILES

The level of activation of the dorsal striatum (**Figure 2A**) during odor fear acquisition was assessed in adults and juveniles using ^{14}C 2-DG autoradiography.

In adults (**Figure 2B**), the Three-Way ANOVA revealed a significant effect of Anteriority [$F_{(1,\ 14)} = 21.65,\ p < 0.001$], Laterality [$F_{(1,\ 14)} = 19.67,\ p = 0.001$] and Laterality × Group interaction [$F_{(1,\ 14)} = 4.51, p = 0.03$]. Further One-Way ANOVA revealed that in the anterior part of the dorsal striatum (upper panel) the level of activation did not vary between groups for both the lateral [$F_{(2,14)} < 1$] and medial [$F_{(2,\ 14)} = 1.24,\ p = 0.32$] parts. In the posterior part of the striatum (lower panel), the One-Way ANOVA revealed a main effect of the Group in the medial part [$F_{(2,\ 14)} = 3.62, p = 0.05$] but no significant effect in the lateral part [$F_{(2,\ 14)} = 2.50,\ p = 0.12$] although the same tendency was observed. *Post-hoc* Fisher tests revealed that in the medial part, the Paired group exhibited a higher level of 2-DG uptake compared to the Odor group ($p = 0.021$) and the unpaired group (tendency, $p = 0.066$).

In juvenile rats (**Figure 2C**), the activation of the striatum was at a similar level between all groups regardless if the measure was taken on the anterior or the posterior dorsal striatum, medial or lateral parts (for all comparisons: $F < 1$).

In summary, in adult rats, odor fear conditioning was associated with an increased activation in the posterior part of the dorsal striatum, while in juveniles no increase was observed.

TEMPORAL PATTERNS FOR FREEZING AND RESPIRATION DURING ACQUISITION: INFANTS SHOW A TEMPORAL PATTERN OF US EXPECTANCY

In order to assess the ability of animals of the different ages to encode interval duration in our odor fear conditioning paradigm, the temporal patterns of responses of animals conditioned to a 30 s and to a 20 s CS-US interval were compared in adult and infant rats. For both ages, we examined the temporal patterns of freezing and respiration during the CS presentation in 1-s time bins. The average curves of the last four odor-shock pairings were pooled together for each parameter (i.e., freezing and respiratory rate). Both parameters were compared between and within groups using a Two-Way ANOVA with factor Group (Paired 20 s, Paired 30 s, and Odor) and repeated factor Time. The comparison was made on the common CS duration between the Paired 20 s and Paired 30 s groups (1–19 s).

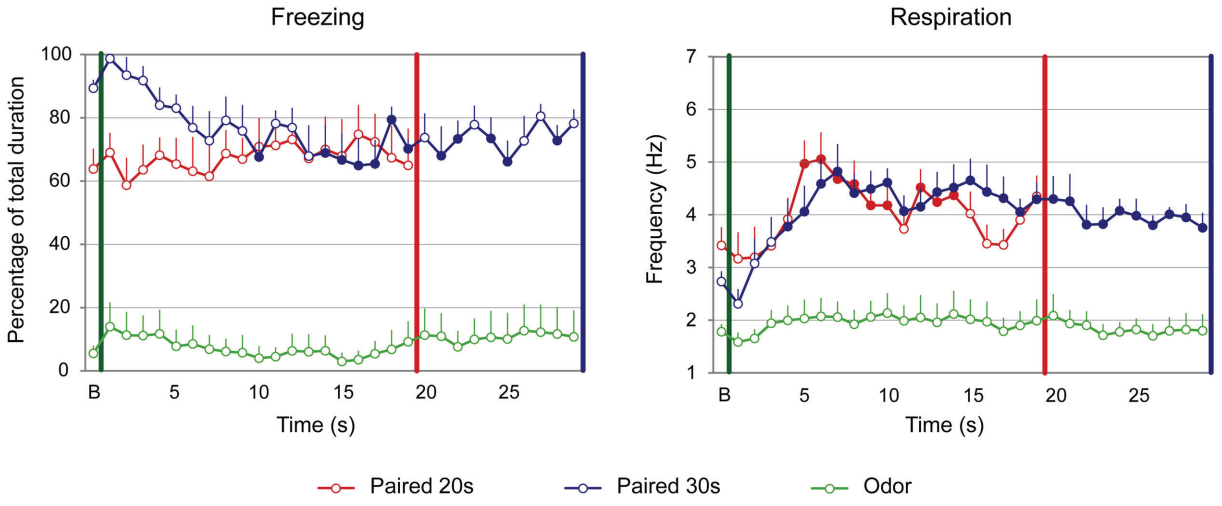


FIGURE 3 | Effect of odor-shock conditioning on fine-grain temporal pattern of freezing and respiration during odor presentation in adult rats. The temporal pattern is represented with a 1-s bin precision, from the odor onset (green vertical line on each graph) to shock arrival (red and blue vertical line on each graph) for the paired groups. Point B on the x-axis represents the averaged baseline. Paired 20 s group: red ($n = 8$), Paired 30 s group: blue ($n = 8$) and Odor group: green ($n = 9$). Filled circles on each curve indicate the values that are significantly different from the baseline ($p < 0.05$).

Adults

For freezing (**Figure 3**, left panel), the ANOVA revealed a significant effect of Group [$F_{(2, 22)} = 51.709$, $p < 0.001$], Time [$F_{(18, 396)} = 1.906$, $p = 0.014$] and Group × Time interaction [$F_{(36, 396)} = 1.831$, $p = 0.003$]. Further analyses revealed that both Paired groups showed higher levels of freezing than the Odor group [Paired 20 s vs. Odor, Group: $F_{(1, 15)} = 52.737$, $p < 0.001$; Paired 30 s vs. Odor, Group: $F_{(1, 15)} = 125.292$, $p < 0.001$]. In addition, there was a significant difference between Paired 20 s and Paired 30 s groups temporal patterns during CS presentation [Paired 20 s vs. Paired 30 s, Group × Time: $F_{(18, 252)} = 2.456$, $p = 0.001$]. *Post-hoc* within group comparisons showed that, in Paired 30 s animals, introduction of the CS induced a significant decrease in freezing (at seconds 10, 14 to 19, 21, 22, and 28 of the CS, $p < 0.05$) compared to baseline. In the Paired 20 s or in the Odor group no change in freezing rate was observed in presence of the CS odor.

Concerning respiration (**Figure 3**, right panel), the ANOVA revealed a significant effect of Group [$F_{(2, 22)} = 14.498$, $p < 0.001$], Time [$F_{(18, 396)} = 13.033$, $p < 0.001$] and Group × Time interaction [$F_{(36, 396)} = 3.341$, $p < 0.001$]. Further analyses revealed a significantly higher respiratory rate in the Paired groups compared to the Odor group [Paired 20 s vs. Odor, Group: $F_{(1, 15)} = 20.85$, $p < 0.001$; Paired 30 s vs. Odor, Group: $F_{(1, 15)} = 22.927$, $p < 0.001$], as well as a significant difference between Paired 20 s and Paired 30 s groups temporal patterns [Paired 20 s vs. Paired 30 s, Group × Time: $F_{(18, 252)} = 2.551$, $p = 0.001$]. In addition, within-group comparisons showed that while Odor animals showed almost no reaction upon odor arrival compared to baseline due to habituation, Paired animals' respiration rate increased significantly following odor onset. In particular, in Paired 20 s animals the increase was significant from seconds 5 to 14 of the CS ($p < 0.05$), after which the rate returned to baseline value ($p > 0.05$). In Paired 30 s animals, the respiratory rate increased significantly from second 4 of the CS until the shock arrival ($p < 0.05$).

In order to assess whether the temporal patterns of freezing and respiratory rate described above for the Paired groups are related to the CS-US interval, we tested whether they respected the scalar property as explained in the Methods.

When considering the freezing curves of Paired 20 s and Paired 30 s groups (**Figure 4**, upper part), superposition was better under the additive transform ($\eta^2 = 0.49$, right side) than under the multiplicative transform ($\eta^2 = 0.26$, middle) or no transform ($\eta^2 = 0.24$, left side). In contrast, for respiration (**Figure 4**, lower part), superposition was better under the multiplicative transform ($\eta^2 = 0.85$, middle) than under the additive transform ($\eta^2 = 0.58$, right side) or no transform ($\eta^2 = 0.82$, left side). The foregoing analyses were based on absolute response values for each dependent measure. When data were re-plotted in relative response rate on the Y axis, the results were similar, showing superior superposition with additive transform for freezing (additive: $\eta^2 = 0.67$, multiplicative: $\eta^2 = 0.36$, no transform: $\eta^2 = 0.20$), and with multiplicative transform for respiration (multiplicative: $\eta^2 = 0.82$, additive: $\eta^2 = 0.53$, no transform: $\eta^2 = 0.80$). Thus, the scalar property was best respected for respiration while it was not observed for freezing.

In summary, adult rats exhibited different temporal patterns of freezing and respiration rates for the two CS-US intervals. Scalar rules were respected for the respiratory rate but not for freezing, which confirms our previous data (Shionoya et al., 2013).

Infants

The temporal patterns of freezing and respiration rate were assessed in infants using the same analysis parameters as for adults.

Concerning freezing (**Figure 5**, left side), the ANOVA evidenced a tendency for a Group effect [$F_{(2, 27)} = 3.01$, $p = 0.066$],

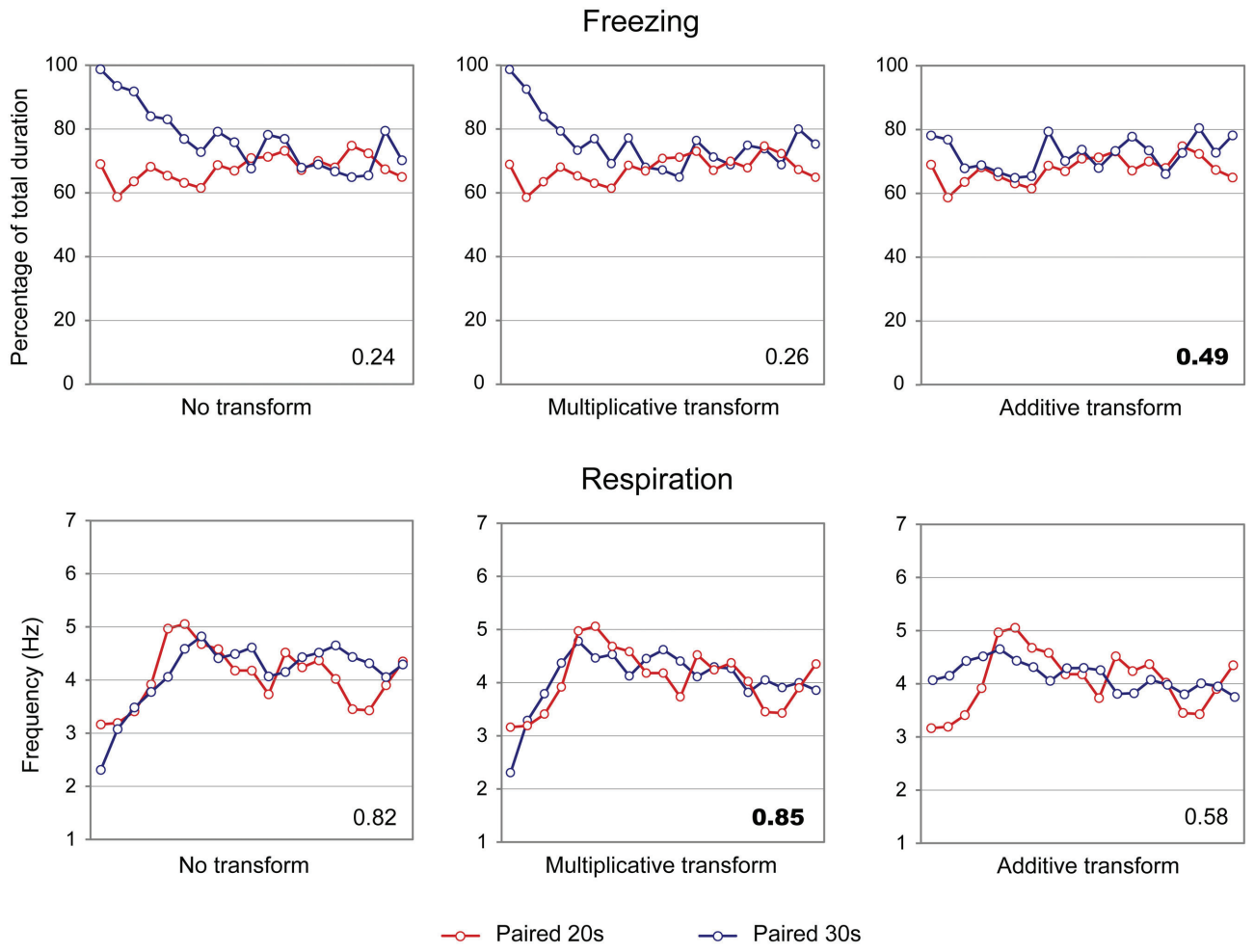


FIGURE 4 | Scalar property test on the freezing (upper part) and respiration (lower part) temporal patterns in adult rats. The scalar timing rule predicts better superposition of the curves in relative time (multiplicative transform, **middle panel**), compared to no rescaling (**left panel**) or rescaling by an additive shift of the x-axis (**right panel**). Superposition between the two curves was indexed by eta-square (η^2) indicated in the bottom right of each graph, the highest values being highlighted in bold characters.

and a significant effect of Time [$F_{(18,\ 486)} = 12.988$, $p < 0.001$] and Group × Time interaction [$F_{(36,\ 486)} = 6.656$, $p < 0.001$]. Further analysis revealed that both Paired groups showed significantly different levels of freezing than Odor group [Paired 20 s vs. Odor, Group: $F_{(1,\ 18)} = 4.256$; $p = 0.054$; Paired 30 s vs. Odor, Group: $F_{(1,\ 18)} = 4.489$, $p = 0.048$]. In addition, the temporal patterns of Paired 20 s and Paired 30 s animals were significantly different [Paired 20 s vs. Paired 30 s, Group × Time: $F_{(18,\ 324)} = 4.811$, $p < 0.001$], although similar levels of baseline and pre-shock (3 last seconds before shock) freezing were observed in both groups ($p > 0.05$). In infants, introduction of the CS odor induced a strong decrease in freezing in the Paired groups. Indeed, within group comparisons showed that, in Paired 20 s animals, this decrease was significantly different from baseline from second 6 until shock arrival ($p < 0.05$), whereas in the Paired 30 s group significance was reached from second 17 until shock arrival ($p < 0.05$).

Concerning the respiration (**Figure 5**, right panel), the ANOVA revealed an effect of Group [$F_{(2,\ 27)} = 17.588$, $p < 0.001$], Time [$F_{(18,\ 486)} = 22.209$, $p < 0.001$] and of the Group × Time interaction [$F_{(36,\ 486)} = 5.123$, $p < 0.001$]. Further analysis evidenced that in both Paired groups the respiratory rate was significantly higher than in the Odor group [Paired 20 s vs. Odor, Group: $F_{(1,\ 18)} = 98.076$, $p < 0.001$; Paired 30 s vs. Odor, Group: $F_{(1,\ 18)} = 10.581$, $p = 0.004$]. In addition, the temporal patterns of Paired 20 s and Paired 30 s animals were significantly different [Paired 20 s vs. Paired 30 s, Group × Time: $F_{(18,\ 324)} = 3.753$, $p < 0.001$], although similar respiratory rates were observed at baseline and prior the shock arrival in the two groups ($p > 0.05$). Within group comparisons showed that, in the Paired 20 s group, introduction of the CS Odor induced a significant increase in respiratory rates compared to baseline from second 3 of the CS until shock arrival ($p < 0.05$), whereas in Paired 30 s animals, the increase reached significance from second 6 until the end of the CS ($p < 0.05$).

When the scalar property was tested on the freezing curves (**Figure 6**, upper part), the highest superposition index was obtained for the multiplicative transform ($\eta^2 = 0.82$, middle)

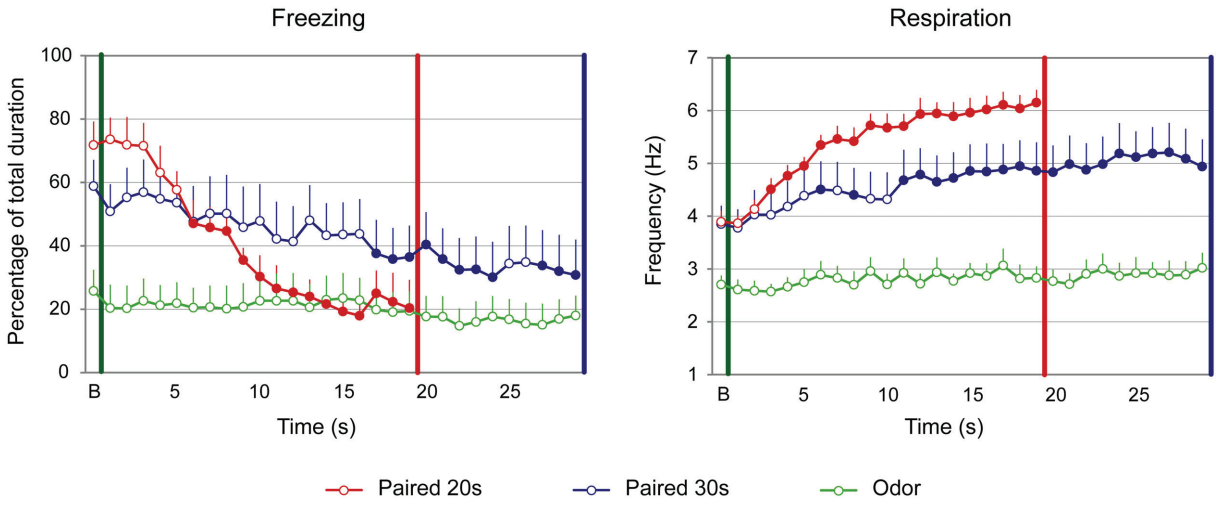


FIGURE 5 | Effect of odor-shock conditioning on fine-grain temporal pattern of freezing and respiration during odor presentation in infant pups. The temporal pattern is represented with a 1-s bin precision, from the odor onset (green vertical line on each graph) to shock arrival (red and blue vertical line on each graph) for the paired groups. Point B on the x-axis represents the averaged baseline. Paired 20 s group: red ($n = 10$), Paired 30 s group: blue ($n = 10$) and Odor group: green ($n = 10$). Filled circles on each curve indicate the points that are significantly different from the baseline ($p < 0.05$).

compared to additive transform ($\eta^2 = 0.71$, right side) or no transform ($\eta^2 = 0.70$, left side). Similar results were observed for the respiratory rate curves (**Figure 6**, lower panel; multiplicative: $\eta^2 = 0.61$, additive: $\eta^2 = 0.53$, no transform: $\eta^2 = 0.48$). When response rates were re-plotted in relative values on the Y axis, the results were similar, showing superior superposition with multiplicative transform for freezing (multiplicative: $\eta^2 = 0.85$, additive: $\eta^2 = 0.78$, no transform: $\eta^2 = 0.67$), and for respiration (multiplicative: $\eta^2 = 0.91$, additive: $\eta^2 = 0.63$, no transform: $\eta^2 = 0.82$). Thus, in infant rats, the scalar property was respected for both respiration and freezing.

In summary, infant rats showed different temporal patterns of freezing and respiration rates for the two duration intervals. Both freezing and respiration curves followed the scalar rules, thus supporting the hypothesis that infant pups expressed temporal learning.

DISCUSSION

The present study investigated the ontogeny of time durations encoding in odor fear conditioning. We first assessed whether the striatum, which is a brain area implicated in timing, was differentially activated in odor fear conditioning throughout development. This is the first study to assess striatum activity across development within this paradigm. The 2-DG metabolic mapping study revealed that, while dorsal striatum was activated during odor fear acquisition in adults, its activity remained unchanged in juveniles. These data are in agreement with data on striatum development, which indicates the juvenile striatum is still maturing (Chronister et al., 1976; Tepper and Trent, 1993; Tepper et al., 1998). To investigate interval timing abilities before and after the striatum functional maturation, we performed fine-grain analysis of behavioral and physiological responses shown to be valuable for assessment of timing in adults during the early stages of odor fear learning. Specifically, we monitored the time course of the animal's respiratory rate and freezing behavior during conditioning at two developmental ages: one with striatum activity correlated with learning (adult) and the other for which the striatum has been shown to be immature in the literature (infant). The data showed that for both adult and infant rats, duration-related temporal patterns can be detected for freezing and/or respiration curves suggesting that infants are able to encode time durations as well and as quickly as adults while their striatum is not yet functional.

IN ADULT ANIMALS RESPIRATION RATE IS A RELIABLE INDEX OF TIME ENCODING

The present data show that in adult animals, the temporal patterns of respiration rate in the Paired 20 and 30 s groups were significantly different and followed the scalar property. In contrast, freezing temporal patterns, although different, did not respect scalar rules. These data confirm the results we obtained in a previous study using a slightly different paradigm (Shionoya et al., 2013). Indeed in that study, the same animals were first conditioned to a 20 s odor-shock interval and then shifted to a 30 s interval. This resulted in a shift of the temporal pattern of respiration toward the new duration. However, while for analytical reasons studies of timing usually manipulate the interval durations within rather than between subjects (Brown et al., 1992), this procedure may lead to biases in the temporal pattern of conditioned responses due to the previously learned duration. Here we show that differential patterns are observed when different groups of animals are used for the 20 and 30 s CS-US intervals, thus when the two groups underwent an equivalent amount of training.

The present study also confirms that, in adults, respiration is a more sensitive index than freezing to investigate the emergence of duration-related temporal patterns within a few trials (Shionoya et al., 2013). Indeed, the respiratory rate pattern respected the

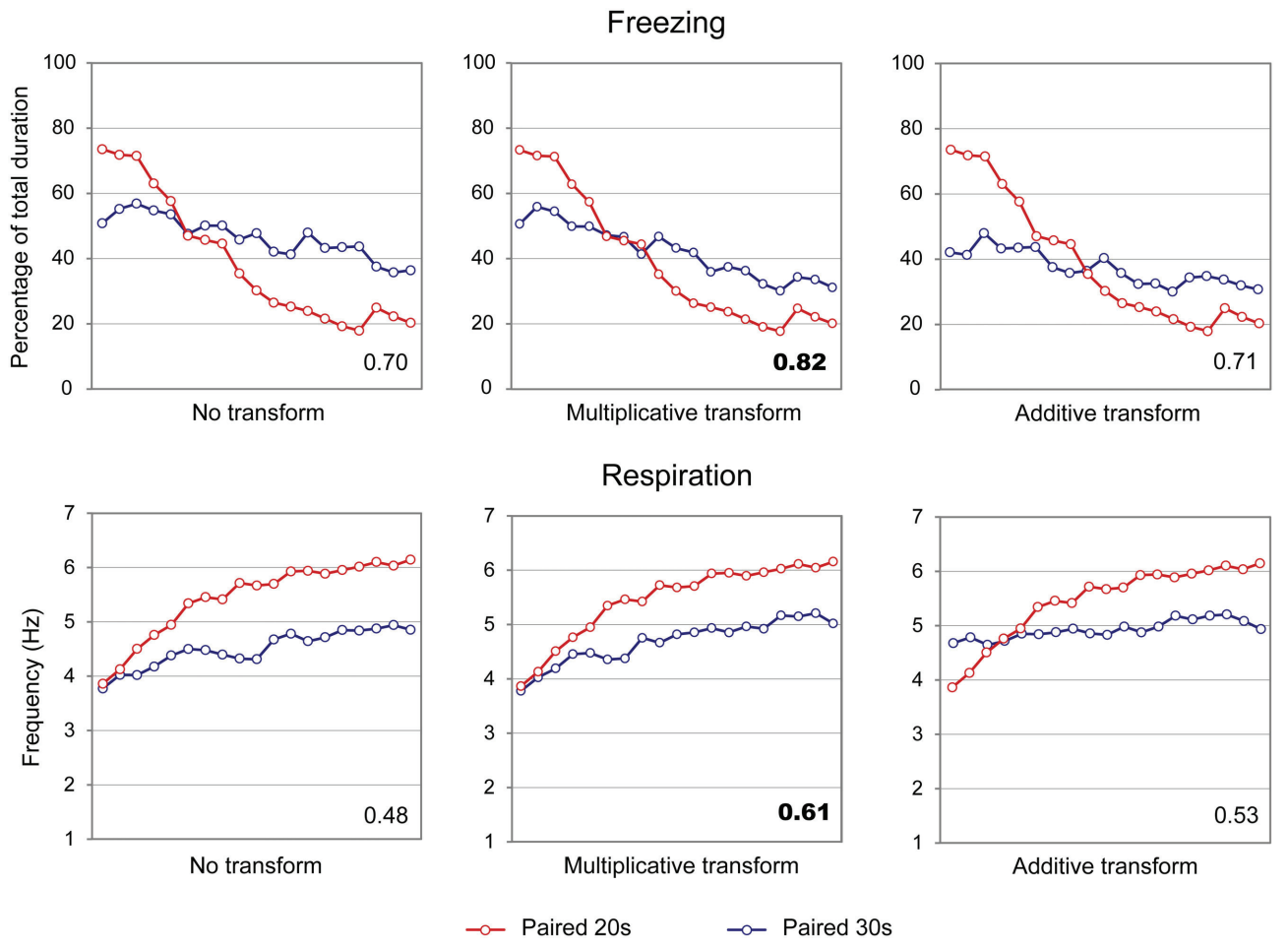


FIGURE 6 | Scalar property test on the freezing (upper part) and respiration (lower part) temporal patterns in infant rats. The scalar timing rule predicts better superposition of the curves in relative time (multiplicative transform, middle panel), compared to no rescaling (left panel) or rescaling by an additive shift of the x-axis (right panel). Superposition between the two curves was indexed by eta-square (η^2) indicated in the bottom right of each graph, the highest values being highlighted in bold characters.

scalar property (Gibbon, 1977). This property refers to the observation that, in interval timing, the variability in the temporal behavior of an animal grows proportionally with the duration of the timed stimulus. This was not observed for the freezing temporal patterns suggesting that respiration is a more reliable index than freezing to assess interval timing in odor fear conditioning. This property might be due to the fact that respiratory rate is a highly fluctuant signal which can be modulated both by the sampling of odorants (Macrides et al., 1982; Youngentob et al., 1987; Kepecs et al., 2007; Wesson et al., 2008) and by the acquired emotional valence of the stimulus (Freeman et al., 1983; Monod et al., 1989; Nsegbe et al., 1997) thus allowing the observation of subtle transient variations in the animal's fear levels.

INFANT ANIMALS SHOW INTERVAL TIMING ABILITIES

In infants, both the respiration and the freezing rates showed clear temporal patterns respecting the scalar property. To our knowledge, our study is the first to show interval timing in 12–15 days old infant rats. Indeed previous studies devoted to investigate the ontogenesis of temporal learning of seconds-to-minutes intervals in rats were performed on animals aged of 21 days at the beginning of training (Lejeune et al., 1986; Lejeune, 1992). Only slightly younger ages had been investigated on the sub-second range (17-day-old: Stanton et al., 1992). The lack of data in the literature concerning younger ages can be explained by the fact that classical paradigms used to investigate interval timing in animals use peak interval procedures (Catania, 1971) or temporal discrimination tasks (Stubbs, 1968), both of which require numerous conditioning sessions and behavioral responses beyond the infants' motor abilities. In the present study, the use of fine-grain analysis of the temporal patterns of both respiration and freezing permitted us to highlight interval timing abilities occurring after only a few odor-shock pairings. This observation in rats is in line with data collected in human babies showing that they can be conditioned to temporal regularities within a few reinforced trials as early as at 1 month of age (Fitzgerald et al., 1967). In this study, Fitzgerald and colleagues used light/dark regularly spaced switches to evidence that, after about 10 switches, human infants show regular

pupillary constriction or dilatation regardless if the switch occurs or not. A recent study using operant discriminative conditioning in 4-months-old babies confirmed a relatively high sensitivity to time at early ages (Provasi et al., 2011).

Interestingly in our study the use of complementary indices such as freezing and respiration permitted us to highlight parameters that revealed timing indices changes throughout development. Indeed, in infants, contrary to adults, freezing appears to be a good index of interval timing. Infant rats respond to the CS odor by a strong decrease in freezing. While it is unclear why freezing was a better measure of timing in pups compared to adults, it may be related to pups' immature freezing response (Hunt and Campbell, 1997).

INVOLVEMENT OF THE DORSAL STRIATUM IN ODOR FEAR CONDITIONING

The 2-DG autoradiograph revealed that, in adult Paired rats, the medial part of the posterior striatum showed an increased activity compared to Unpaired and Odor animals. A growing literature suggests the involvement of the striatum in interval timing (Allen et al., 1972; Hikosaka et al., 1989; Matell et al., 2003; Höhn et al., 2011). According to McGeorge and Faull (1989), the lateral dorsal striatum receives projections from the sensori-motor cortex, while the medial posterior dorsal striatum receives inputs from the piriform cortex (McGeorge and Faull, 1989) and the amygdala (McDonald, 1991). Therefore, the difference we observe between localizations of the striatum activation might be due to the paradigm and modalities used.

The dorsal striatum has also been suggested to be involved in aversive learning in general such as in auditory fear conditioning (Ferreira et al., 2003; Kishioka et al., 2009; Wendler et al., 2014), or in a two-way active avoidance task (Darvas et al., 2011; Wendler et al., 2014) but not in contextual fear conditioning (Ferreira et al., 2003). Interestingly, both auditory fear conditioning and two-way avoidance present some temporal regularities for the animal to learn, while contextual fear conditioning usually does not. This suggests that the striatum might be preferentially involved in time learning rather than in the learning of the aversion. This is also supported by the results in Unpaired animals of the present study, which showed a similar level of activation in the striatum as the control animals.

In juveniles, our 2-DG metabolic mapping study showed similar levels of activation in the striatum of Paired animals compared to Unpaired and Odor animals. In infants, both morphological (Chronister et al., 1976; Tepper and Trent, 1993) and electrophysiological studies (Tepper et al., 1998) suggest that the striatum is immature. Therefore, at these two developmental ages, the striatum does not seem to be involved in the learning while infant animals in our study and juvenile animals in the literature (Lejeune et al., 1986; Lejeune, 1992; Stanton et al., 1992; Freeman et al., 1993) show clear evidence of learning of interval duration. This raises the question of the neuronal network supporting timing in young animals. It has been demonstrated that neural circuits underlying learning can evolve throughout the development of the organism. The neural substrate of odor-shock associative learning, for example, changes dramatically around PN10. Prior to this age, the association is supported by the olfactory bulb and the anterior piriform cortex (Moriceau et al., 2006). After PN10, the olfactory bulb disengages (Rangel and Leon, 1995), the piriform activation switches from anterior to posterior (Roth and Sullivan, 2005) and the amygdala gets involved in the encoding of the association (Moriceau et al., 2006). Another example of modification of the neural circuit underlying a cognitive process can be found for extinction of conditioned fear. Indeed, while PN24 rats present an adult-like extinction that requires the ventromedial prefrontal cortex (vmPFC), extinction in PN17 rats does not involve the vmPFC (for a review, see Kim and Richardson, 2010). A similar switch throughout the brain maturation could be suggested to underlie time encoding in the brain. While the current model of interval timing encoding proposed in the literature requires a complex communication between the cortex and the striatum (Matell and Meck, 2004), an alternative pathway could be involved in the encoding of interval durations in pups. The olfactory cortex in particular could play a role as it is functional at birth and is known to be involved in odor fear conditioning (Sevelinges et al., 2004, 2008; Jones et al., 2007). Interestingly in a previous study we showed that glutamate and GABA release in the olfactory cortex during odor fear conditioning was correlated to the time of arrival of the CS-US trial suggesting a role for this structure in time encoding (Hegoburu et al., 2009). This is in line with data from the literature showing that sensory cortices are implicated in the processing of temporal information (Quirk et al., 1997; Shuler and Bear, 2006; Bueti et al., 2008). The amygdala could also be involved in interval timing in infants. Indeed a recent study carried out in adult rats reported that changing the CS–US interval during auditory fear memory reactivation induced a selective increase in Zif-268 activity in the lateral nucleus of the amygdala (Díaz-Mataix et al., 2013), and a growing literature suggest that the amygdala may play a role in timing the CS-US interval (Díaz-Mataix et al., 2014). As mentioned above the amygdala is involved in odor fear conditioning from the age of 10 days PN and could thus take part in time processing in infant animals. Finally, alternatively to the striatum, the olfactory tubercle could be considered. Indeed, based on its embryological, anatomical and neuro-chemical properties, this structure is considered as part of the striatum, and has been shown to be functional at early developmental ages (Alheid and Heimer, 1988; Voorn et al., 2004). A recent review by Wesson and Wilson (2011) highlighted the involvement of this structure in both basic and complex olfactory functions and its potentially critical role in interfacing sensory processing and behavioral response. Indeed the olfactory tubercle receives direct olfactory sensory input from the olfactory bulb and piriform cortex (Luskin and Price, 1983) and additional input from the olfactory amygdala (Krettek and Price, 1978; Ubeda-Bañon et al., 2007), thus enabling the association of a given olfactory stimulus with its learned emotional valence. Therefore, although the involvement of the olfactory tubercle in timing has not been investigated yet, this structure could act as a short pathway to link perception with the production of temporally structured actions, specifically at early developmental ages.

In conclusion, the present study shows that in odor fear conditioning, interval durations are learned after only few trials from a very early age. Although the underlying neural network remains

to be elucidated, and may evolve with ontogeny, these findings support the hypothesis of a simultaneous encoding of the associative link between two events together with their temporal relationships (Balsam and Gallistel, 2009; Balsam et al., 2010). While further experiments are needed to assess temporal learning at earlier ages than those used in the present study, our data suggest that associative and temporal learning might be two sides of the same coin.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNRS-PICS program, Partner University Fund Emotion & Time, LIA CNRS-NYU LearnEmoTime, ANR-Memotime, ANR-TDE, COST-Action TIMELY, NIH-DC009910, NIH-MH091451. This work was performed within the framework of the LABEX CORTEX (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). The authors gratefully acknowledge Ounsa Ben-Hellal for taking care of the animals.

REFERENCES

Alheid, G., and Heimer, L. (1988). New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* 27, 1–39.

Allen, J. D., Mitcham, J. C., and Byrd, J. I. (1972). Effects of caudate lesions on the acquisition and retention of Sidman avoidance in the rat. *Psychon. Sci.* 27, 157–160.

Balsam, P. D., Drew, M. R., and Gallistel, C. (2010). Time and associative learning. *Comp. Cogn. Behav. Rev.* 5, 1. doi: 10.3819/ccbr.2010.50001

Balsam, P. D., and Gallistel, C. R. (2009). Temporal maps and informativeness in associative learning. *Trends Neurosci.* 32, 73–78. doi: 10.1016/j.tins.2008.10.004

Block, R. A., Zakay, D., and Hancock, P. A. (1999). Developmental changes in human duration judgments: a meta-analytic review. *Dev. Rev.* 19, 183–211.

Brown, B. L., Hemmes, N. S., and De Vaca, S. C. (1992). Effects of intratrial stimulus change on fixed-interval performance: the roles of clock and memory processes. *Anim. Learn. Behav.* 20, 83–93.

Brown, K. L., Pagani, J. H., and Stanton, M. E. (2006). The ontogeny of interstimulus interval (ISI) discrimination of the conditioned eyeblink response in rats. *Behav. Neurosci.* 120, 1057. doi: 10.1037/0735-7044.120.5.1057

Bueti, D., Bahrami, B., and Walsh, V. (2008). Sensory and association cortex in time perception. *J. Cogn. Neurosci.* 20, 1054–1062. doi: 10.1162/jocn.2008.20060

Buhusi, C. V., and Meck, W. H. (2005). What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 755–765. doi: 10.1038/nrn1764

Catania, A. C. (1971). Reinforcement schedules: the role of resposes preceding the one that produces the reinforcer. *J. Exp. Anal. Behav.* 15, 271–287.

Chronister, R., Farnell, K., Marco, L., and White, L. Jr. (1976). The rodent neostriatum: a Golgi analysis. *Brain Res.* 108, 37–46.

Coull, J. T., Cheng, R.-K., and Meck, W. H. (2011). Neuroanatomical and neurochemical substrates of timing. *Neuropsychopharmacology* 36, 3–25. doi: 10.1038/npp.2010.113

Darvas, M., Fadok, J. P., and Palmiter, R. D. (2011). Requirement of dopamine signaling in the amygdala and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. *Learn. Mem.* 18, 136–143. doi: 10.1101/lm.2041211

Díaz-Mataix, L., Ruiz Martinez, R. C., Schafe, G. E., Ledoux, J. E., and Doyère, V. (2013). Detection of a temporal error triggers reconsolidation of amygdala-dependent memories. *Curr. Biol.* 23, 467–472. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.053

Díaz-Mataix, L., Tallot, L., and Doyère, V. (2014). The amygdala: a potential player in timing CS–US intervals. *Behav. Processes* 101, 112–122. doi: 10.1016/j.beproc.2013.08.007

Droit-Volet, S. (2011). "Child and time," in *Multidisciplinary Aspects of Time and Time Perception*, eds A. Vatakis, A. Esposito, M. Giagkou, F. Cummins and G. Papadelis (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag), 151–172.

Ferreira, T. L., Moreira, K. M., Ikeda, D. C., Bueno, O. F., and Oliveira, M. G. M. (2003). Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Res.* 987, 17–24. doi: 10.1016/S0006-8993(03)03217-7

Fitzgerald, H. E., Lintz, L. M., Brackbill, Y., and Adams, G. (1967). Time perception and conditioning an autonomic response in human infants. *Percept. Mot. Skills* 24, 479–486.

Freeman, J. H., Nicholson, D. A., Muckler, A. S., Rabinak, C. A., and Dipietro, N. T. (2003). Ontogeny of eyeblink conditioned response timing in rats. *Behav. Neurosci.* 117, 283. doi: 10.1037/0735-7044.117.2.283

Freeman, J. H., Spencer, C. O., Skelton, R. W., and Stanton, M. E. (1993). Ontogeny of eyeblink conditioning in the rat: effects of US intensity and interstimulus interval on delay conditioning. *Psychobiology* 21, 233–242.

Freeman, W. J., Viana Di Prisco, G., Davis, G., and Whitney, T. M. (1983). Conditioning of relative frequency of sniffing by rabbits to odors. *J. Comp. Psychol.* 97, 12.

Gibbon, J. (1977). Scalar expectancy theory and Weber's law in animal timing. *Psychol. Rev.* 84, 279.

Hegoburu, C., Sevelinges, Y., Thévenet, M., Gervais, R., Parrot, S., and Mouly, A.-M. (2009). Differential dynamics of amino acid release in the amygdala and olfactory cortex during odor fear acquisition as revealed with simultaneous high temporal resolution microdialysis. *Learn. Mem.* 16, 687–697. doi: 10.1101/lm.1584209

Hegoburu, C., Shionoya, K., Garcia, S., Messaoudi, B., Thévenet, M., and Mouly, A.-M. (2011). The RUB cage: respiration–ultrasonic vocalizations–behavior acquisition setup for assessing emotional memory in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 5:25. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00025

Hikosaka, O., Sakamoto, M., and Usui, S. (1989). Functional properties of monkey caudate neurons. III. Activities related to expectation of target and reward. *J. Neurophysiol.* 61, 814–832.

Höhn, S., Dallérac, G., Faure, A., Urbach, Y. K., Nguyen, H. P., Riess, O., et al. (2011). Behavioral and *in vivo* electrophysiological evidence for presymptomatic alteration of prefrontostriatal processing in the transgenic rat model for huntington disease. *J. Neurosci.* 31, 8986–8997. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1238-11.2011

Hunt, P. S., and Campbell, B. A. (1997). "Developmental dissociation of the components of conditioned fear," in *Learning, Motivation and Cognition: the Functional Behaviorism of Robert C. Bolles*, eds M. E. Bouton and M. S. Fanselow (Washington, DC: American Psychological Association), 53–74.

Jones, S. V., Stanek-Rattiner, L., Davis, M., and Ressler, K. J. (2007). Differential regional expression of brain-derived neurotrophic factor following olfactory fear learning. *Learn. Mem.* 14, 816–820. doi: 10.1101/lm.781507

Kepecs, A., Uchida, N., and Mainen, Z. F. (2007). Rapid and precise control of sniffing during olfactory discrimination in rats. *J. Neurophysiol.* 98, 205–213. doi: 10.1152/jn.00071.2007

Kim, J. H., and Richardson, R. (2010). New findings on extinction of conditioned fear early in development: theoretical and clinical implications. *Biol. Psychiatry* 67, 297–303. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.09.003

Kishioka, A., Fukushima, F., Ito, T., Kataoka, H., Mori, H., Ikeda, T., et al. (2009). A novel form of memory for auditory fear conditioning at a low-intensity unconditioned stimulus. *PLoS ONE* 4:e4157. doi: 10.1371/journal.pone.0004157

Krettek, J., and Price, J. (1978). Amygdaloid projections to subcortical structures within the basal forebrain and brainstem in the rat and cat. *J. Comp. Neurol.* 178, 225–253.

Lejeune, H. (1992). Response timing and development: Fixed-interval performance in precociously weaned rats. *Q. J. Exp. Psychol. B* 44, 101–122.

Lejeune, H., Jasselette, P., Nagy, J., and Peree, F. (1986). Fixed interval performance in weanling rats: a comparison with adult and senile subjects. *Physiol. Behav.* 38, 337–343.

Luskin, M. B., and Price, J. L. (1983). The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* 216, 264–291.

Macrides, F., Eichenbaum, H. B., and Forbes, W. B. (1982). Temporal relationship between sniffing and the limbic rhythm during odor discrimination reversal learning. *J. Neurosci.* 2, 1705–1717.

Matell, M. S., and Meck, W. H. (2000). Neuropsychological mechanisms of interval timing behavior. *Bioessays* 22, 94–103. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200001)22:1<94::AID-BIES14>3.0.CO;2-E

Matell, M. S., and Meck, W. H. (2004). Cortico-striatal circuits and interval timing: coincidence detection of oscillatory processes. *Cogn. Brain Res.* 21, 139–170. doi: 10.1016/j.cogbrainres.2004.06.012

Matell, M. S., Meck, W. H., and Nicolelis, M. A. (2003). Interval timing and the encoding of signal duration by ensembles of cortical and striatal neurons. *Behav. Neurosci.* 117, 760. doi: 10.1037/0735-7044.117.4.760

McDonald, A. (1991). Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience* 44, 1–14.

McGeorge, A., and Faull, R. (1989). The organization of the projection from the cerebral cortex to the striatum in the rat. *Neuroscience* 29, 503–537.

Meck, W. H., Penney, T. B., and Pouthas, V. (2008). Cortico-striatal representation of time in animals and humans. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 145–152. doi: 10.1016/j.conb.2008.08.002

Monod, B., Mouly, A.-M., Vigouroux, M., and Holley, A. (1989). An investigation of some temporal aspects of olfactory coding with the model of multi-site electrical stimulation of the olfactory bulb in the rat. *Behav. Brain Res.* 33, 51–63.

Moriceau, S., Wilson, D. A., Levine, S., and Sullivan, R. M. (2006). Dual circuitry for odor–shock conditioning during infancy: corticosterone switches between fear and attraction via amygdala. *J. Neurosci.* 26, 6737–6748. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0499-06.2006

Nsegbe, E., Vardon, G., Perruchet, P., and Gallego, J. (1997). Classic conditioning of the ventilatory responses in rats. *J. Appl. Physiol.* 83, 1174–1183.

Pavlov, I. P. (1927). *Conditioned Reflexes. An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex.* London: Oxford University Press.

Paxinos, G., and Watson, C. (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact, 6th Edn*. New-York, NY: Academic.

Provasi, J., Rattat, A.-C., and Droit-Volet, S. (2011). Temporal bisection in 4-month-old infants. *J. Exp. Psychol.* 37, 108. doi: 10.1037/a0019976

Quirk, G. J., Armony, J. L., and Ledoux, J. E. (1997). Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala. *Neuron* 19, 613–624. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80375-X

Raineki, C., Holman, P. J., Debiec, J., Bugg, M., Beasley, A., and Sullivan, R. M. (2010). Functional emergence of the hippocampus in context fear learning in infant rats. *Hippocampus* 20, 1037–1046. doi: 10.1002/hipo.20702

Rangel, S., and Leon, M. (1995). Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. *Dev. Brain Res.* 85, 187–191. doi: 10.1016/0165-3806(94)00211-H

Roth, T. L., and Sullivan, R. M. (2005). Memory of early maltreatment: neonatal behavioral and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. *Biol. Psychiatry* 57, 823–831. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.01.032

Sevelinges, Y., Gervais, R., Messaoudi, B., Granjon, L., and Mouly, A.-M. (2004). Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learn. Mem.* 11, 761–769. doi: 10.1101/lm.83604

Sevelinges, Y., Sullivan, R. M., Messaoudi, B., and Mouly, A.-M. (2008). Neonatal odor-shock conditioning alters the neural network involved in odor fear learning at adulthood. *Learn. Mem.* 15, 649–656. doi: 10.1101/lm.998508

Shionoya, K., Hegoburu, C., Brown, B. L., Sullivan, R. M., Doyère, V., and Mouly, A.-M. (2013). It's time to fear! Interval timing in odor fear conditioning in rats. *Front. Behav. Neurosci.* 7:128. doi: 10.3389/fnbeh.2013.00128

Shuler, M. G., and Bear, M. F. (2006). Reward timing in the primary visual cortex. *Science* 311, 1606–1609. doi: 10.1126/science.1123513

Smith, M. C. (1968). CS-US interval and US intensity in classical conditioning of the rabbit's nictitating membrane response. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 66, 679. doi: 10.1037/h0026550

Smith, M. C., Coleman, S. R., and Gormezano, I. (1969). Classical conditioning of the rabbit's nictitating membrane response at backward, simultaneous, and forward CS-US intervals. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 69, 226. doi: 10.1037/h0028212

Stanton, M. E., Freeman, J. H., and Skelton, R. W. (1992). Eyeblink conditioning in the developing rat. *Behav. Neurosci.* 106, 657. doi: 10.1037/0735-7044.106.4.657

Stubbs, A. (1968). The discrimination of stimulus duration by pigeons. *J. Exp. Anal. Behav.* 11, 223–238. doi: 10.1901/jeab.1968.11-223

Sullivan, R. M., Landers, M., Yeaman, B., and Wilson, D. A. (2000). Neurophysiology: Good memories of bad events in infancy. *Nature* 407, 38–39. doi: 10.1038/35024156

Sullivan, R. M., and Leon, M. (1986). Early olfactory learning induces an enhanced olfactory bulb response in young rats. *Dev. Brain Res.* 27, 278–282. doi: 10.1016/0165-3806(86)90256-7

Takahashi, L. K. (1992). Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male conspecifics in preweanling rats. *Physiol. Behav.* 52, 493–498. doi: 10.1016/0031-9384(92)90336-Z

Tepper, J. M., Sharpe, N. A., Koos, T., and Trent, F. (1998). Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light-and electron-microscopic studies. *Dev. Neurosci.* 20, 125–145. doi: 10.1159/000017308

Tepper, J. M., and Trent, F. (1993). *In vivo* studies of the postnatal development of rat neostriatal neurons. *Prog. Brain Res.* 99, 35–35. doi: 10.1016/S0079-6123(08)61337-0

Ubeda-Bañon, I., Novejarque, A., Mohedano-Moriano, A., Pro-Sistiaga, P., De La Rosa-Prieto, C., Insausti, R., et al. (2007). Projections from the posterolateral olfactory amygdala to the ventral striatum: neural basis for reinforcing properties of chemical stimuli. *BMC Neurosci.* 8:103. doi: 10.1186/1471-2202-8-103

Voorn, P., Vanderschuren, L. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., and Pennartz, C. (2004). Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *Trends Neurosci.* 27, 468–474. doi: 10.1016/j.tins.2004.06.006

Wendler, E., Gaspar, J. C., Ferreira, T. L., Barbiero, J. K., Andreatini, R., Vital, M. A., et al. (2014). The roles of the nucleus accumbens core, dorsomedial striatum, and dorsolateral striatum in learning: performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. *Neurobiol. Learn. Mem.* 109, 27–36. doi: 10.1016/j.nlm.2013.11.009

Wesson, D. W., Donahou, T. N., Johnson, M. O., and Wachowiak, M. (2008). Sniffing behavior of mice during performance in odor-guided tasks. *Chem. Senses* 33, 581–596. doi: 10.1093/chemse/bjn029

Wesson, D. W., and Wilson, D. A. (2011). Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell: hedonics, sensory integration, and more? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 655–668. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.08.004

Youngentob, S. L., Mozell, M. M., Sheehe, P. R., and Hornung, D. E. (1987). A quantitative analysis of sniffing strategies in rats performing odor detection tasks. *Physiol. Behav.* 41, 59–69. doi: 10.1016/0031-9384(87)90131-4

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 28 March 2014; paper pending published: 07 April 2014; accepted: 25 April 2014; published online: 15 May 2014.

Citation: Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers JL, Londen E, Rousselot J, Szyba K, Thévenet M, Sullivan-Wilson TA, Doyère V, Sullivan RM and Mouly A-M (2014) Infant rats can learn time intervals before the maturation of the striatum: evidence from odor fear conditioning. Front. Behav. Neurosci. ***8****:176. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00176*

This article was submitted to the journal Frontiers in Behavioral Neuroscience.

Copyright © 2014 Boulanger Bertolus, Hegoburu, Ahers, Londen, Rousselot, Szyba, Thévenet, Sullivan-Wilson, Doyère, Sullivan and Mouly. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Etude 2 : Ontogenèse de la réponse émotionnelle au choc et vocalisations ultrasoniques

Introduction aux vocalisations ultrasoniques

La deuxième partie de ce travail de thèse est consacrée à une étude fine de la réponse vocale ultrasonique du rat au stimulus inconditionné, le choc, en lien avec le comportement et la respiration. En effet, le rat émet des vocalisations ultrasoniques lorsqu'il se trouve en situation aversive et ces vocalisations présentent de grandes différences dans leurs caractéristiques entre la jeune enfance et l'âge adulte. Toutefois, peu d'études ont décrit ces vocalisations ultrasoniques en utilisant un protocole expérimental similaire tout au long de l'ontogenèse. Je décrirai donc dans un premier temps ce qui est connu des vocalisations et leur mode d'induction chez le rat aux différents âges. Je présenterai ensuite l'étude que nous avons réalisée sur les vocalisations du rat de l'enfance à l'âge adulte en réponse à un même stimulus aversif.

Comme brièvement évoqué dans le paragraphe précédent, le rat émet des vocalisations lorsqu'il est confronté à des situations riches émotionnellement. Toutefois, les caractéristiques et le contexte d'émission de ces vocalisations sont grandement modulés par l'âge de l'animal. Il est important de noter que nous ne parlerons ici que des vocalisations du rat. La souris et les autres rongeurs émettent également des vocalisations mais leurs caractéristiques et le contexte dans lequel elles sont émises ainsi que leur lien à d'autres paramètres comme la respiration sont nettement différentes de ce qui est observé chez le rat (Chabout et al. 2012; Sirotin et al. 2014; Lahvis et al. 2011).

Les rats émettent des vocalisations variées. Certaines d'entre elles sont émises dans des fréquences audibles par l'homme (tout expérimentateur qui a déjà manipulé un rat contrarié l'a déjà entendu « couiner »), mais la vaste majorité de leurs vocalisations présentent des fréquences ultrasoniques (> 16-20 kHz selon les auteurs), non audibles par l'oreille humaine donc. Nous nous intéresserons principalement à ces dernières, les vocalisations ultrasoniques, et les noterons USV (pour *UltraSonic Vocalizations*). Par abus de langage et facilitation de la lecture, « vocalisation » dans l'ensemble du texte qui suit concernera les vocalisations ultrasoniques, sauf spécifié autrement.

I. Les organes de production des vocalisations

Contrairement aux vocalisations audibles, produites par la vibration des cordes vocales chez l'homme comme chez l'animal, les vocalisations ultrasoniques sont produites par un phénomène de sifflet généré par le passage du flux expiratoire contraint dans le larynx (voir Figure 32 pour une description du larynx).

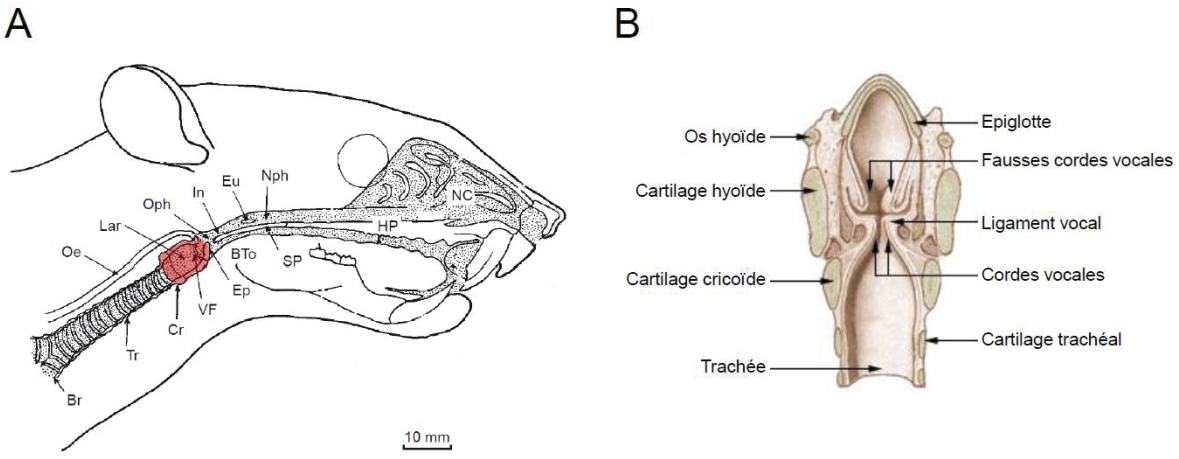


Figure 32 : A. Positionnement du larynx dans le système respiratoire du rat : coupe sagittale des voies respiratoires supérieures du rat. Abréviations : Br : Bronches, BTo : Base de la langue, Cr : Cartilage cricoïde du larynx, Ep : Epiglotte, Eu : ouverture des tubes d'Eustache, HP : Palais, In : choanes (orifices postérieurs internes

des cavités nasales), Lar : Larynx, NC : Cavité Nasale, NPh : Nasopharynx, Oe : Œsophage, Oph : Orthopharynx, SP : Voile du palais, Tr : Trachée, VF : Cordes vocales (Brudzynski and Fletcher 2010, 71). B. Anatomie détaillée du larynx (Page wikipédia du larynx)

1. Le larynx : structure clé de la production des vocalisations audibles et ultrasoniques

Chez le rat, les vocalisations audibles présentent généralement une fréquence fondamentale comprise entre 2 et 4 kHz, et de nombreuses harmoniques. Elles sont produites par vibration des cordes vocales par passage d'un air sous pression venant des poumons : les cordes vocales se ferment, entraînant une surpression dans la partie inférieure du larynx (ou glotte, Figure 33Ba), puis s'ouvrent lorsque la pression sous-glottale atteint un seuil, libérant l'air sous-glottal plus pressurisé dans la partie supérieur du larynx (Figure 33Bb) et autorisant les cordes vocales à se refermer permettant la pression sous-glottale d'augmenter à nouveau (Figure 33Bc). L'air expiré est alors pulsé, formant un son. La fréquence de ce son est modulée par la tension et la masse des cordes vocales qui déterminent leur seuil d'ouverture. Les harmoniques des vocalisations audibles sont vraisemblablement crées par résonance dans la partie supérieure de l'appareil respiratoire.

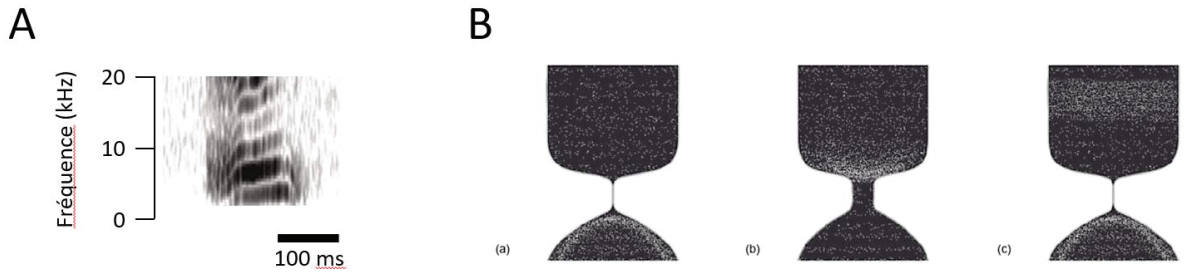


Figure 33 : A. Exemple de spectrogramme d'une vocalisation audible enregistrée chez le raton, tracé personnel. B. Modification de la pression sous- et sup-glottale engendrée par les vibrations des cordes vocales. (a) augmentation de la pression sous-glottale. (b) Libération de l'air pressurisé dans la partie sup-glottale et diminution de la pression dans la partie sous-glottale. (c) Ré-augmentation de la pression sous-glottale (Finck and Lejeune 2010, 433).

Les vocalisations ultrasoniques, contrairement aux vocalisations audibles, sont constituées de sons purs (une fréquence simple), ne présentant pas ou très peu d'harmoniques et sont émises à des fréquences nettement plus élevées. De plus, elles peuvent varier en amplitude et en fréquence très rapidement (exemple des USV à 50 kHz chez l'adulte, voir Figure 37). Par ailleurs, la fréquence des USV produites par le rat est fortement modifiée lorsque le rat respire un mélange He-O_2, contrairement aux vocalisations audibles (Roberts 1975b). Enfin, il est possible de générer des USV chez le rat anesthésié en stimulant la substance grise périaqueducale et d'observer ses cordes vocales par micro-endoscope lors de l'émission des USV. Une telle observation a permis de confirmer l'absence de vibration des cordes vocales lorsque les USV sont émies (Sanders et al. 2001). Toutefois, les cordes vocales semblent tout de même jouer un rôle puisqu'elles adoptent une position distinctive, fermement opposées, avec seul un faible orifice de 1 à 2 mm ouvert à l'arrière, contre les cartilages aryténoïdes. (Sanders et al. 2001).

L'ensemble de ces paramètres rend très peu probable la production des USV par vibration des cordes vocales et tend à suggérer un mécanisme de sifflet. La structure anatomique qui pourrait produire un tel sifflet chez le rat serait vraisemblablement le larynx (Roberts 1975a). En effet, la dénervation du larynx chez le rat adulte empêche la production d'USV (Nunez et al. 1985; Roberts 1972). Chez le raton de 10 jours, la section du nerf laryngeal inférieur empêche toute production d'USV et celle du nerf laryngeal supérieur les modifie grandement en réduisant l'amplitude des USV, en

augmentant leur fréquence fondamentale moyenne et en en réduisant le nombre émis (Wetzel et al. 1980).

Des études complémentaires enregistrant la pression sous-glottale, le flux d'air dans la trachée et l'activité des muscles du larynx chez l'animal vigile confirme que l'activité des muscles du larynx est critique dans la l'émission des USV (Riede 2011, 2013). L'étude de l'activité de ces muscles permet également de contrôler la fréquence de l'USV émise, ainsi que mesuré chez l'animal vigile (Riede 2011). Enfin, il est possible de produire des sons ayant les caractéristiques fréquentielles des USV en faisant passer un flux d'air dans un larynx *ex vivo*. Lorsque les cordes vocales de ce larynx excisé sont contractées de manière à fermer partiellement l'orifice entre les deux cordes, il est alors possible de reproduire l'ensemble des fréquences ultrasoniques produites par le rat (Johanson and Teicher 1980).

Le larynx est donc la structure qui permet la production des USV en adoptant la forme d'un sifflet. Un sifflet est constitué de deux trous espacés d'une longueur L. Le premier orifice est d'un diamètre D et d'une épaisseur e qui influent également sur le son produit par le sifflet. Dans le cas des USV, le premier orifice est donc situé au niveau des cordes vocales, par constriction de ces dernières, et le second orifice serait alors situé au niveau de l'ortho-pharynx, vraisemblablement contrôlé par l'épiglotte et la base de la langue (voir Figure 32), 1 à 1,5 mm plus haut dans le tractus respiratoire. La fréquence de l'ultrason produit est alors dépendante de plusieurs paramètres liés la conformation du larynx résumés sur la Figure 34, et de la pression sous-glottale contrôlée par la respiration.

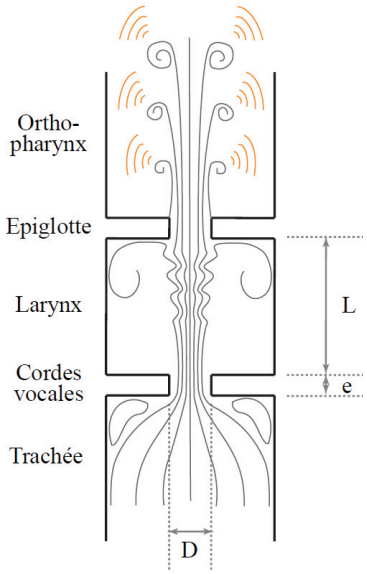


Figure 34 : Mécanisme de sifflet dans le larynx. Le flux d'air est représenté en traits plus fins. D : diamètre de l'orifice, e : épaisseur de l'orifice, L : distance entre les 2 orifices.

2. La respiration : souffle indispensable pour siffler

Ainsi que nous l'avons mentionné dans le paragraphe précédent, les USV sont émis pendant la phase expiratoire du cycle respiratoire (Anderson 1954) au cours de laquelle le flux d'air passant dans le larynx est modulé par la forme du larynx (contrôlée par sa contraction), ce qui génère des ultrasons. Le contrôle de cette expiration est donc critique dans la génération des USV. Laurence H. Roberts (1972) a le premier décrit de manière systématique l'association entre l'expiration et la production de longues vocalisations chez le rat adulte, étude qui a été confirmée par plusieurs autres montrant une association étroite entre les USV, une profonde expiration et une augmentation du rythme cardiaque et de la pression sanguine (Frysztak and Neafsey 1991; Antoniadis and McDonald 1999; Walker and

Carrive 2003). Une étude de notre laboratoire est allée plus loin en montrant une corrélation forte entre la durée de l'expiration et celle de l'USV associé (Hegoburu et al. 2011). Cette corrélation forte des durées suggère que l'émission d'un USV contraint la respiration, forçant l'allongement de la phase expiratoire et/ou que la respiration limite la longueur de l'USV. Par ailleurs, comme le suggère les tracés respiratoires Figure 35, les vocalisations sont souvent émises à l'intérieur d'épisode respiratoires rapides (Sirotin et al. 2014).

Ce lien entre les USV et la respiration est décrit également chez le raton (Hofer and Shair 1992) : lorsque des ratons sont mis en hypothermie profonde, leur respiration devient lente, permettant de constater la cooccurrence des USV avec des expirations impliquant des muscles différents de ceux impliqués dans les expirations silencieuses, les muscles abdominaux se contractent, le raton s'étire et la tête s'élève.

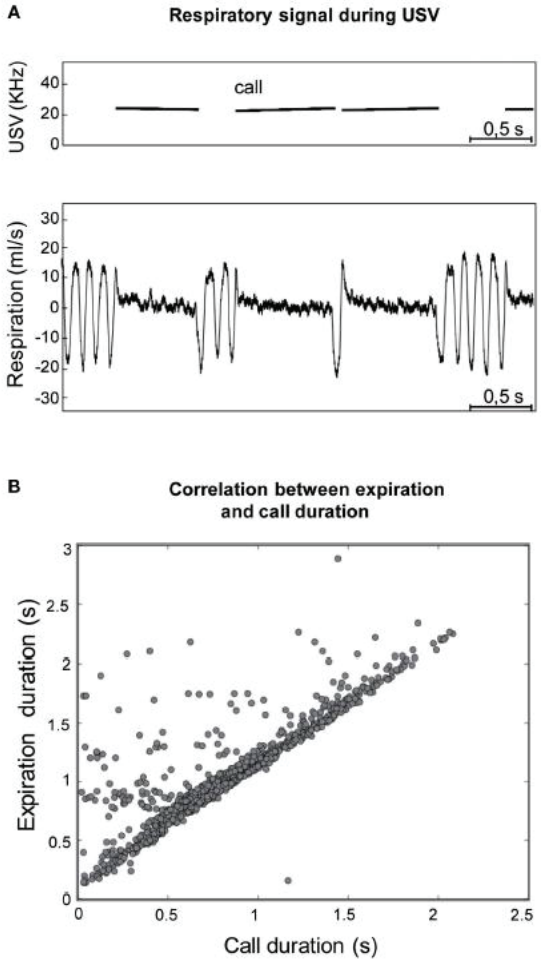


Figure 35 : A. Exemple de respiration (en bas) observée au cours de l'émission d'USV (spectrogramme de fréquence en haut). B. Corrélation entre la durée des USV et celle de l'expiration associée. (Hegoburu et al. 2011).

Enfin, la modulation du flux respiratoire permet aussi la modulation fréquentielle de l'USV : la pression sous-glottale (à l'entrée du larynx) varie entre 0.5 et 2.5 kPa. Les pressions les plus faibles génèrent des USV à fréquence plus basse et une pression plus élevée augmente la fréquence de l'USV (Riede 2011, 2013).

II. Les différents types de vocalisations ultrasoniques

Comme précisé plus haut, les USV sont caractérisées par des sons purs, ne présentant pas ou peu d'harmoniques. Comparées aux vocalisations audibles, elles sont plus atténuées par la distance, l'humidité ou la poussière et plus facilement déviées par des obstacles, les rendant moins facilement localisables à longue distance. A courte distance, au contraire, plus la fréquence d'un son est élevée, plus il est localisable par le receveur en utilisant la différence interaurale (Branchi et al. 2001), ce qui rend les USV particulièrement appropriés pour guider une mère vers son petit par exemple. Ces caractéristiques les rendent spécialement adaptés aux petits mammifères proies vivant dans des terriers que sont les rats (Brudzynski and Fletcher 2010).

1. Chez l'adulte

Chez le rat adulte, deux types d'USV sont couramment décrites, des vocalisations à une fréquence moyenne de 22 kHz et d'autres centrées autour de 50 kHz.

a. Les vocalisations à 22 kHz

Le premier type d'USV est émis en réponse à des situations aversives de type agonistiques (Lore et al. 1976; Van Der Poel and Miczek 1991), de défense contre un prédateur (Blanchard et al. 1991; Brudzynski and Ociepa 1992), en réponse à des stimulations aversives ou surprenantes (Kaltwasser 1990; Van Der Poel and Miczek 1991; Wöhr et al. 2005; Hegoburu et al. 2011), lors du sevrage de drogues ou de stimulations intracérébrales addictives (Burgdorf et al. 2000; Covington III and Miczek 2003; Vivian and Miczek 1991) et en période post-coïtales chez le mâle (Barfield and Geyer 1972; Van Der Poel and Miczek 1991). Ces USV sont donc interprétées comme un signal d'état émotionnel négatif, de recherche de distanciation vis-à-vis d'un agresseur ou d'un congénère ou de manque. Elles sont d'une durée variant de 300 à 3400 ms par vocalisation et présentent une fréquence généralement comprise entre 18 et 32 kHz, ce qui leur a valu le nom de vocalisations à 22 kHz. A l'intérieur de ces vocalisations, il est suggéré que l'on peut en distinguer deux sous-types selon leur durée: les vocalisations courtes, d'une durée inférieure à 300 ms, et les longues[14], d'une durée supérieure à 300 ms (Brudzynski et al. 1993). Certains auteurs suggèrent que les vocalisations de courte et de longue durée pourraient refléter des états émotionnels négatifs distincts, les USV courtes signalant un état de détresse sans source extérieure identifiée de danger alors que les longues signaleraient un état lié à un danger potentiel ou avéré (Brudzynski 2015).

Divers points suggèrent que les USV de 22 kHz reflètent bien un état émotionnel négatif de l'animal. Tout d'abord, la quantité d'USV émise est corrélée à l'intensité de la stimulation aversive, (Hegoburu et al. 2011; Wöhr et al. 2005), voir aussi Figure 36. Par ailleurs, l'injection systémique d'anxiolytiques tels que des benzodiazépines ou des agonistes des récepteurs à la sérotonine ($5HT_{1A}$), diminuent la quantité d'USV émise par le rat en réponse à un conditionnement de peur ou une situation stressante (Cuomo et al. 1988; Jelen et al. 2003). Parallèlement, des drogues anxiogènes peuvent augmenter la quantité d'USV à 22 kHz émise (Jelen et al. 2003).

---

[14] Parmi les USV longue durée, certains auteurs suggèrent une différence entre les USV faiblement modulées en fréquence (1 à 6 kHz entre la fréquence la plus basse et la plus élevé d'un cri), émises en situation aversive et appelées « cri d'alarme », et celles émises par le mâle en situation post-coïtale, plus modulées en fréquence (légères trilles, voir Van Der Poel and Miczek 1991). Nous ne nous attarderons pas plus sur les vocalisations post-coïtales, qui sortent du sujet qui nous intéresse ici.

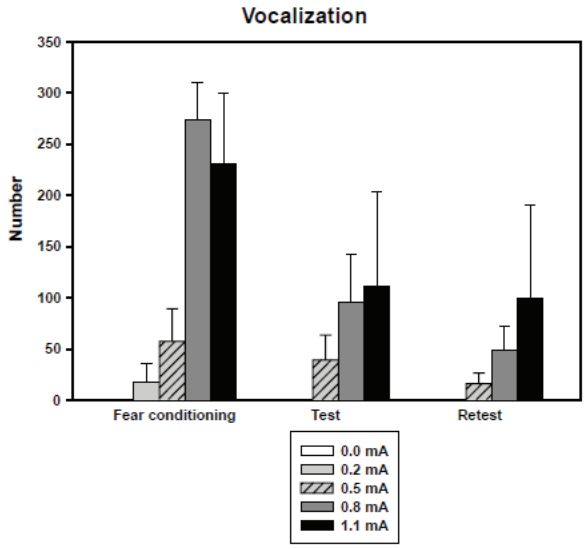


Figure 36 : Nombre d'USVs (moyenne + SEM) émis lorsqu'un rat adulte est soumis à un conditionnement de peur au son (Fear conditionning), et testé pour la peur apprise au son le jour suivant (Test) ou une semaine plus tard (Retest). L'intensité du choc utilisé pour le conditionnement varie entre les différents groupes. (Wöhr et al. 2005)

b. Les vocalisations à 50 kHz

Un second type d'USV est également observé chez le rat adulte : les vocalisations à 50 kHz. Emises dans une gamme allant de 35 à 80 kHz, elles sont décrites en réponse à des situations sociales gratifiantes telles que le jeu (Burgdorf and Panksepp 2001; Knutson et al. 1998), l'interaction sociale (Takahashi et al. 2010) ou sexuelle (Sewell 1967; Mcintosh et al. 1978; McIntosh and Barfield 1980), la prise alimentaire (Buck et al. 2013; Burgdorf et al. 2000; Takahashi et al. 2010), une situation environnementale stimulante (Perez-Sepulveda et al. 2013). Ils sont également observés en réponse à l'injection d'agents addictifs ou à la stimulation intracérébrale du système de récompense (Burgdorf et al. 2000; Knutson et al. 1999). Par ailleurs, les situations aversives diminuent le nombre de vocalisations de 50 kHz émises (Burgdorf et al. 2000, 2001b; Knutson et al. 1998). Les vocalisations de 50 kHz sont donc couramment interprétées comme reflétant un état émotionnel positif et la recherche de contact sociaux agréables. Toutefois, ces vocalisations ont également été enregistrées dans des situations non plaisantes comme un isolement récent (Wöhr et al. 2008). Dans ce cas, les vocalisations de 50 kHz sont interprétées comme servant à maintenir ou rétablir un lien social.

Tout comme pour les vocalisations à 22 kHz, des sous-types de vocalisations à 50 kHz sont décrits (voir Figure 37), et pourraient exprimer des états émotionnels différents. Certains auteurs identifient jusqu'à 14 types de vocalisations à 50 kHz différentes chez le rat (Wright et al. 2010). Ces sous-types peuvent être regroupés en 3 types de vocalisations (Brudzynski 2015): les premières, sans modulation de fréquence, sont émises principalement lorsque le rat est isolé ou lorsqu'il consomme de la nourriture (Takahashi et al. 2010; Wöhr et al. 2008). Les autres vocalisations sont caractérisées par une fréquence modulée (non-constante sur la durée de la vocalisation) et seraient plus émises dans des situations gratifiantes, ou fortement motivantes (ex : interactions sexuelles, interactions sociales d'établissement des rangs hiérarchiques,…). Parmi ces vocalisations, on peut encore distinguer celle présentant des trilles (voir Figure 37) et celles n'en présentant pas. En effet, des études ont montré qu'elles étaient modulées de manière différente par l'injection de drogues (Simola 2015; Wright et al. 2010, 2012), par l'attente de nourriture (Buck et al. 2013; Garcia et al. 2015) et par la stimulation par l'expérimentateur (Garcia et al. 2015). Les vocalisations modulées en fréquence sans trille répondraient donc à un signal de récompense ou un état motivationnel alors que celles

présentant des trilles seraient plus liées à des situations très riches émotionnellement (Brudzynski 2015).

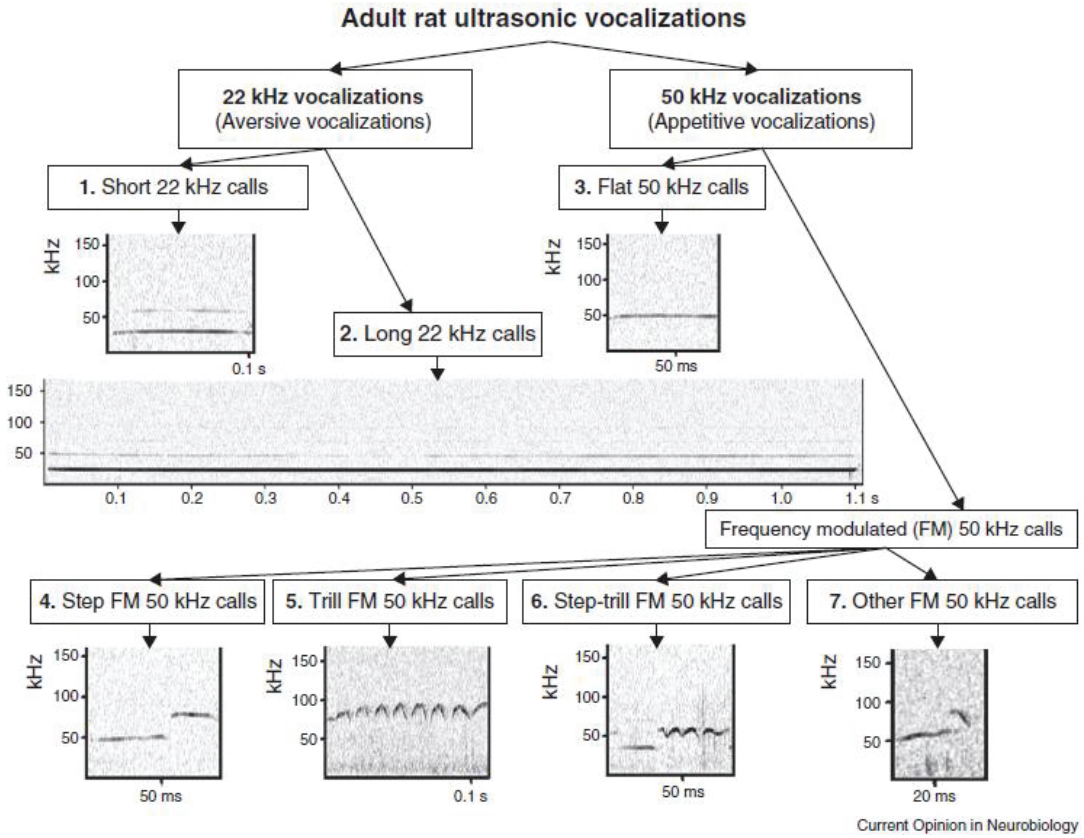


Figure 37 : Classification des USV du rat adulte selon Brudzynski (2013). Exemples de sonogrammes des vocalisations de 22 kHz (courtes 1 et longues 2) et 50 kHz sans modulation de fréquence (3), ou modulées en fréquence sous forme de marche (4), de trille (5), d'une combinaison marche-trille (6) ou autre (7).

Les rats adultes émettent donc deux grands types de vocalisations caractérisées par des bandes de fréquence différentes. Ces deux types de vocalisations sont émises dans des contextes émotionnels opposés, les vocalisations à 22 kHz étant associées à des états émotionnels négatifs et celles à 50 kHz à des états émotionnels plutôt positifs.

2. Chez le raton

a. Caractéristique des USV émis

A sa naissance, le raton n'émet que très peu d'USV, la majorité de ses vocalisations étant émises dans le registre audible. Ces vocalisations audibles sont principalement émises quand le raton est très jeune (PN2), dans le nid et que la mère est présente (Ihnat et al. 1995). Par la suite, les USV prennent le relais des vocalisations audibles lorsque le raton est isolé du nid (Noirot 1968; Hofer and Shair 1978), exposé au froid (Okon 1970; Allin and Banks 1971; Oswalt and Meier 1975; Blumberg et al. 1992), lorsque de l'extinction d'une tâche opérante (Amsel et al. 1977) ou qu'il est exposé à une odeur prédisant un malaise gastrique (Weber et al. 2000). L'émission d'USV est faible dans les 2

premiers jours suivant la naissance et augmente dramatiquement dans les jours suivants (Noirot 1968). Ces vocalisations sont classiquement associées à une activité locomotrice importante et de nombreux changements d'orientation (*pivot*), que l'on peut interpréter comme une recherche active (Wöhr and Schwarting 2008).

Les vocalisations du raton sont classiquement décrites comme courtes (< 300 ms) et centrées en fréquence autour de 40 à 50 kHz (30-65 kHz, variable selon les auteurs, vraisemblablement variable selon l'âge du raton). Cette observation a conduit de très nombreux expérimentateurs à étudier ces vocalisations en filtrant les fréquences enregistrées par un filtre passe-bande centré autour de 40-50 kHz (Allin and Banks 1971; Amsel et al. 1977; Blumberg et al. 1992; Gardner 1985; Hodgson et al. 2008; Hofer and Shair 1978; Ise and Ohta 2009; Noirot 1968; Oswalt and Meier 1975; Shair et al. 2012; Takahashi et al. 1991; Weber et al. 2000). Toutefois, une étude par Brudzynski et collègues (1999) a montré que les fréquences émises par les ratons recouvraient l'ensemble du spectre ultrasonique de 20 à 120 kHz.

b. Les causes de l'émission des USV chez le raton

La raison de l'émission d'USV par le raton n'est à l'heure actuelle pas consensuelle, deux hypothèses principales étant formulées :

(1) les USV reflèteraient la balance entre un état d'anxiété et un état de confort. Dans le cadre de cette hypothèse, elles sont souvent appelées « USV de détresse ».
(2) les USV chez le raton pourraient être un effet secondaire lié à la thermo-régulation. En effet, lorsque le raton est isolé du nid et de la chaleur maternelle, sa température corporelle chute et il commence à produire de la chaleur via son tissu adipeux brun : pour permettre une augmentation de cette production de chaleur, il faut augmenter le transport de l'oxygène vers ce tissu ce qui est permis par une pression thoracique augmentée en bloquant la sortie de l'air au niveau du larynx. Ce larynx contracté produit alors des ultrasons.

Une origine liée à la thermorégulation

Les défenseurs de la deuxième hypothèse s'appuient principalement sur le fait que des ratons de moins d'une semaine ne vocalisent pas s'ils sont isolés à une température équivalente à celle du nid (Allin and Banks 1971; Hofer and Shair 1992; Okon 1971). Par ailleurs, il semble y avoir une corrélation forte entre le début de production de chaleur par le tissu adipeux brun et celui de l'émission d'USV lorsque les ratons sont soumis à des températures décroissantes (Blumberg and Alberts 1990; Hofer and Shair 1992). Enfin, diminuer artificiellement la production de chaleur par le tissu adipeux brun induit une augmentation de la production d'USV et inversement, ce qui est cohérent avec une production des USV artefact de la production de chaleur (Farrell and Alberts 2000).

Toutefois, cette origine thermogénique des USV est controversée. En effet, après la première semaine de vie du raton les USV sont émis en réponse à un isolement, même lorsque le raton est isolé à la température du nid (Oswalt and Meier 1975). De plus, d'autres paramètres que la température peuvent affecter le nombre de vocalisations émises. En effet, la présence de la mère calme les vocalisations du raton même si la température corporelle de la mère est diminuée pour empêcher le raton de se réchauffer à son contact (Hofer and Shair 1978; Hofer et al. 1993). Les ratons vocalisent également moins lorsqu'ils ont l'estomac plein (Nelson and Alberts 2002) et la texture du plancher et l'odeur de leur litière affectent aussi le nombre de vocalisations émises : lorsqu'un raton est placé sur

une surface nue, il vocalise plus que si la surface est recouverte de litière propre et l'utilisation de sa propre litière plutôt que de litière propre réduit encore le nombre de vocalisations émises (Oswalt and Meier 1975).

Un lien anxiété – USV chez le raton

Le lien entre anxiété et vocalisations chez le raton a été assez largement débattu. Un premier ensemble de résultats pharmacologiques semblent montrer une nette corrélation entre le niveau d'anxiété du raton et sa production vocale. En effet, les vocalisations du raton sont modulées par l'injection de drogues anxiolytiques et anxiogènes (Insel et al. 1986; Gardner 1985; Branchi et al. 2001; pour une revue récente, voir Simola 2015). Par ailleurs, introduire un compagnon au contact du raton isolé permet de diminuer le nombre de vocalisations émises (Hofer and Shair 1978).

Toutefois, certaines procédures expérimentales ne suggèrent pas un lien entre anxiété et USV aussi clair. Le phénomène de potentialisation maternelle (*Maternal potentiation*), par exemple, donne des résultats qui peuvent être interprétés de plusieurs manières. Dans ce paradigme, un raton est d'abord isolé dans un environnement à température contrôlée. Comme nous avons vu, il émet des USV en réponse à ce premier isolement. Il est ensuite mis en contact d'une mère généralement anesthésiée. Ce contact inhibe l'émission d'USV par le raton. Enfin, le raton est ré-isolé. On observe alors qu'il émet plus de vocalisations que lorsqu'il est isolé la première fois, on dit que l'émission d'USV est potentialisée par la mère (Hofer et al. 1998). Cette potentialisation de l'émission des USV n'est vraie qu'avec un parent et n'est pas constatée après d'autres contacts qui peuvent diminuer les nombre de vocalisations émises par le raton comme un autre raton ou un mâle inconnu (Hofer et al. 2001). L'interprétation de cette potentialisation des USV du raton comme un signe d'anxiété signifierait que les ratons sont plus anxieux après un bref contact avec la mère qu'avant. Bien que ce soit possible, ce n'est pas forcément intuitif (voir Schwarting and Wöhr 2012 pour une discussion sur ce point) puisque la mère est connue pour inhiber l'axe corticotrope du raton.

Ces hypothèses ne sont pas exclusives

Ces deux hypothèses expliquant l'origine de l'émission des USV ne sont toutefois pas exclusives : certains auteurs proposent que les USV seraient initialement produites en réponse à une hypothermie (ce qui serait peut-être toujours le cas au cours de la première semaine de vie du raton) et, parce qu'ils sont représentatifs de l'état de détresse du raton, elles auraient évolué pour devenir des outils de communication du raton à sa mère, tout comme la piloérection du chat, initialement réflex hypothermique, permet de transmettre un état agressif et défensif (Hofer and Shair 1992). De plus, Kraebel et al. (2002) ont montré que le contexte d'isolation du raton modifiait la cause probable de l'émission des USV. En effet, lorsque les ratons sont isolés une première fois, le taux d'émission des USV est fortement corrélé à leur température corporelle et à la température ambiante, alors qu'une telle corrélation n'est pas observée lorsque les ratons sont ré-isolés après avoir été mis en contact avec la mère (potentialisation maternelle des USV).

Nous avons donc pu voir que les USV chez le raton sont émis dans une bande de fréquence très large (mais principalement étudiée autour de 40 kHz) et que la cause exacte conduisant à leur émission est encore largement spéculative.

3. Le passage d'une vocalisation infantile à une vocalisation adulte

Comme nous avons pu voir, les caractéristiques physiques (fréquence, durée) des USV émises sont grandement modifiées. Toutefois, le lien entre les vocalisations de 40 kHz émises par le raton et celles observées chez l'adulte est peu clair.

Certaines données semblent associer les vocalisations du raton à celles à 22 kHz observées chez l'adulte, la différence de fréquence étant expliquée par la croissance de l'animal. En effet, au cours des premières semaines de vie de l'animal, sa morphologie et sa physiologie changent dramatiquement : il passe d'environ 5 g à 150 g entre PN0 et PN60, son ouïe devient fonctionnelle, ce qui influence grandement la représentation des sons dans le cortex (Kim and Bao 2013; Mowery et al. 2015; Villers-Sidani et al. 2007), sa respiration change (Dutschmann et al. 2009; Paton and Richter 1995), et il passe d'une alimentation lactée à une alimentation solide, impliquant une modification des muscles masticateurs mobilisés (Westneat and Hal 1992). Tous ces points peuvent affecter la production de sons par le larynx compatible avec une diminution de la fréquence de 40 à 22 kHz (Riede et al. 2015; voir aussi Blumberg et al. 2000 pour une corrélation de la fréquence des vocalisations et du poids de l'animal).

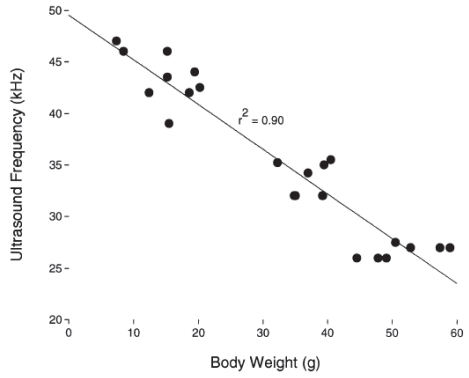


Figure 38 : Corrélation entre le poids du raton et la fréquence des USV qu'il émet (Blumberg et al. 2000).

De plus, les vocalisations du raton et les vocalisations de 22 kHz de l'adulte sont affectées par les drogues anxiolytiques et anxiogènes de manière équivalente (Insel et al. 1986; Gardner 1985; Cuomo et al. 1988; Jelen et al. 2003; Branchi et al. 2001). Ces observations ont conduit plusieurs auteurs à suggérer que les vocalisations de 40 kHz chez le raton seraient équivalentes aux vocalisations à 22 kHz chez l'adulte (Blumberg and Alberts 1991).

Ce lien entre vocalisations du raton et USV à 22 kHz chez l'adulte est également suggéré par la génération de nouvelles lignées de rats sélectionnées selon leur taux de vocalisation en réponse à l'isolement à PN10. Ces lignées présentent des comportements anxieux différents à l'âge adulte : les rats de la lignée sélectionnée sur un taux de vocalisations élevé en réponse à l'isolement à PN10 démontrent plus de comportements de type anxieux à l'âge adulte et émettent plus d'USV de 22 kHz en réponse à des situations anxiogènes que ceux de la lignée sélectionnée pour un taux de vocalisations faible (Brunelli 2005). Un résultat similaire est montré lorsque des rats sont sélectionnés pour des comportements très anxieux à l'âge adulte (très forte défécation dans un open-field à l'âge adulte : Insel and Hill 1987; freezing en réponse à la nouveauté à l'âge adulte Naito et al. 2000; réponse dans un test de labyrinthe en croix à l'âge adulte Wigger et al. 2001) : leur descendance vocalise alors nettement plus en réponse à un isolement dans l'enfance.

Toutefois, d'autres auteurs soulignent des différences entre USV à 22 kHz et USV chez le raton: tout d'abord, certaines drogues peuvent avoir des effets contraires chez le raton et l'adulte. Schwarting

et Wöhr (2012) décrivent ainsi que la norépinephrine a un effet anxiogène chez le rat adulte mais diminue les vocalisations du raton (Farrell and Alberts 2000) alors que la clonidine, anxiolytique à l'âge adulte, les augmente (Kehoe and Harris 1989). Par ailleurs, si comme nous l'avons décrit précédemment il est possible de créer des lignées de rats aux comportements de type anxieux en sélectionnant des ratons qui vocalisent beaucoup (échelle évolutive), cette relation directe entre les vocalisations pendant l'enfance et à l'âge adulte n'est pas vraie à l'échelle de l'individu : les ratons qui vocalisent le plus à l'isolement deviennent les rats qui passent le plus de temps dans les bras ouverts d'un test en croix, soit des rats peu anxieux (Schwarting RKW & Pawlak CR 2004, cité dans Schwarting and Wöhr 2012), et le nombre de vocalisations émises par le raton en réponse à un isolement est négativement corrélé au nombre de vocalisations qu'il émet au cours d'un conditionnement de peur au son une fois adulte (Wöhr and Schwarting 2008).

Le lien entre USV chez le raton et USV à 22 kHz chez l'adulte n'est donc pas parfaitement clair. Schouten (1988), quant à lui, suggère que les vocalisations infantiles sont le reflet à la fois des vocalisations à 22 et 50 kHz observées chez l'adulte. Il suggère qu'elles évoluent en donnant à la fois les vocalisations adultes de 22 et de 50 kHz (voir Figure 39).

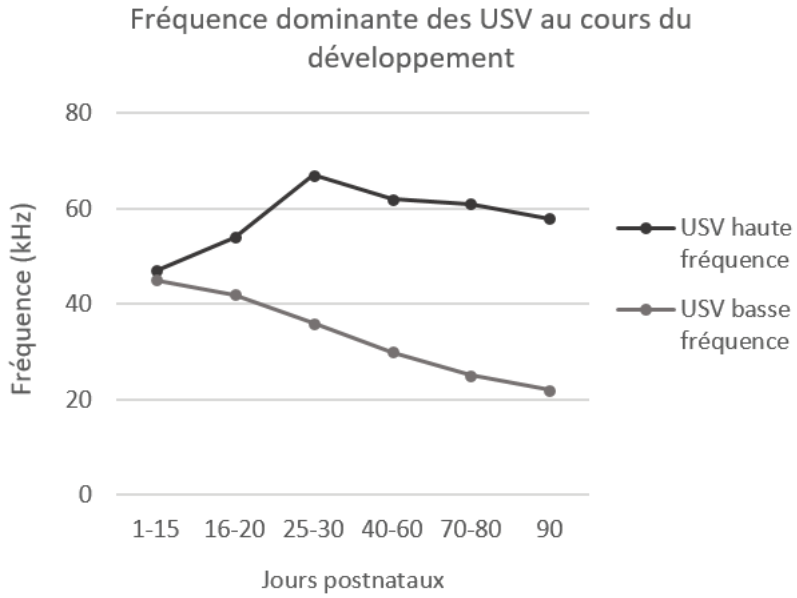


Figure 39 : Modification de la fréquence dominante des USV haute et basse fréquence au cours du développement (adapté de Schouten 1988).

III. Circuits et neuromodulateurs impliqués dans les vocalisations

1. Chez l'adulte

Chez le rat adulte, les vocalisations à 22 kHz et à 50 kHz ne sont pas modulées de la même manière (voir Figure 40) : les premières semblent dépendre du système cholinergique et en particulier des récepteurs muscariniques, alors que les vocalisations à 50 kHz ont été liées à l'activité du système dopaminergique.

Ainsi, l'injection d'agoniste des récepteurs cholinergique muscarinique dans le noyau latérodorsal du tegmentum (LTD) ou dans les aires qu'il innerve en fibres cholinergiques, telles que l'aire pré-optique latérale, l'aire hypothalamique antérieure, le septum, génère des vocalisations à 22

kHz (Brudzynski 1994; Brudzynski and Barnabi 1996; Brudzynski and Bihari 1990). La stimulation du LTD ne permet pas l'émission d'USV si l'activité des structures en aval est antagonisée (Brudzynski and Barnabi 1996), suggérant que ces structures sont bien nécessaires à la production d'USV à 22 kHz. Enfin, la durée des USV est modulée par la quantité d'agoniste injecté. L'intensité de la stimulation cholinergique permet donc de contrôler l'émission de vocalisations à 22 kHz courtes ou longues (qui semblent refléter des états émotionnels aversifs distincts). Ce rôle clé du système cholinergique semble commun à un ensemble de mammifères, et a été notamment montré chez le chat (Brudzynski 2010)

Les vocalisations de 50 kHz, quant à elles, sont contrôlées par le système dopaminergique issu de l'aire tegmentale ventrale (VTA). Ainsi, l'injection d'agonistes dopaminergiques dans le noyau accumbens génère des vocalisations de 50 kHz (Burgdorf et al. 2001a). Par ailleurs, la stimulation électrique d'aires connues pour supporter l'auto-stimulation (aires du système de récompense) telles que les cortex préfrontal, le noyau accumbens, le pallidum ventral, l'aire préoptique latérale et l'hypothalamus latéral, induit l'émission de vocalisations de 50 kHz (Burgdorf et al. 2007).

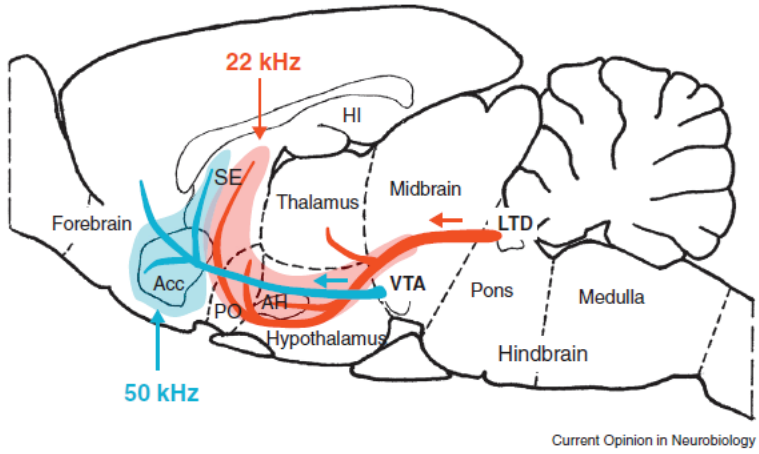


Figure 40 : Section para-sagittale d'un cerveau de rat montrant les systèmes cholinergique (rouge) et dopaminergique (bleu) contrôlant l'émission de vocalisations de 22 et 50 kHz respectivement. Acc : noyau accumbens ; AH : aire hypothalamique antérieure ; LTD : noyau latérodorsal du tegmentum ; PO : aire pré-optique latérale ; SE : septum. (Brudzynski 2013)

2. Chez le raton

Chez le raton, le substrat neuro-anatomique des USV n'a pas été clairement défini. Une étude par Middlemis-Brown et al (2005) a démontré que des ratons donc le télencéphale a été retiré par aspiration ou séparé du diencéphale et du tronc cérébral par décérébration sont encore capables d'émettre des USV lorsqu'ils sont soumis au froid. Toutefois, ces ratons ne vocalisent plus en réponse à une isolation à la température du nid, suggérant que c'est le flux d'information du télencéphale au tronc cérébral qui permet les vocalisations en réponse à une isolation. Dans cette étude, le mésencéphale n'est majoritairement pas touché par l'aspiration ou la décérébration, or une étude par Wiedenmayer et collègues (2000) ont montré que des lésions électrolytiques de la substance grise périaqueducale (PAG) diminuait de manière drastique les vocalisations. Toutefois, si la PAG semble être la structure génératrice des vocalisations, d'autres structures corticales et sous-corticales semblent capables d'en moduler activité. Ainsi, l'inactivation du noyau accumbens bloque toute émission d'USV chez le raton, en réponse à l'isolation et au froid (Muller et al. 2010).

Par ailleurs, comme chez le rat adulte, un ensemble de neurotransmetteurs modulent les USV du raton (pour revue, voir Branchi et al. 2001). Le système dopaminergique par exemple semble impliqué puisque l'injection d'agonistes des récepteurs D1, D2 et D3 réduit le nombre de vocalisations émises. Au contraire, les systèmes noradrénergique et glutamatergique augmentent le nombre d'USV émises lorsqu'ils sont stimulés. D'autres systèmes peuvent avoir des rôles bi-directionnels. C'est le cas

du système sérotoninergique dont la modulation peut augmenter ou diminuer le nombre d'USV émises : en effet, l'injection d'agonistes des récepteurs $5HT_{1A}$ et $5HT_{2A}$ diminue l'émission d'USV alors que celle d'agonistes des récepteurs $5HT_{1B}$ l'augmente. Les opiacés modulent également les USV du raton : alors que les agonistes des récepteurs μ et δ réduisent l'émission d'USV, les agonistes des récepteurs κ les augmente (Branchi et al. 2001).

IV. Les vocalisations comme signal de communication

Le rat dispose d'un système auditif tout à fait capable de percevoir les ultrasons. Son cortex auditif présente des neurones répondant spécifiquement aux fréquences ultrasoniques (Kim and Bao 2013). Par ailleurs, si les études des capacités auditives du rat réduisent généralement ses capacités auditives à des fréquences inférieures à 70 kHz (Kelly and Masterton 1977; Zheng et al. 1992), Du et al (2007) ont montré une sensibilité du noyau cochléaire à des fréquences allant jusqu'à 90 kHz. Par conséquent, les USV émis par un congénère peuvent être perçus par un rat receveur et l'étude du comportement du receveur permet de rechercher si ces vocalisations peuvent jouer le rôle d'un signal de communication.

1. Chez l'adulte : effet sur un congénère

a. Les vocalisations à 22 kHz

L'émission d'USV à 22 kHz semble être un signal émis à destination des congénères pour signifier un état émotionnel négatif de l'émetteur. Ainsi, la présence d'un receveur facilite la production d'USV par l'émetteur (Blanchard et al. 1991). Des expériences rejouant à des rats adultes l'enregistrement d'USV montrent une modification de leur comportement : la présentation de vocalisations à 22kHz entraîne une modification du comportement des rats ainsi que l'émission de vocalisations par le receveur (Blanchard et al. 1990; Beckett et al. 1997). Plus spécifiquement, le receveur se met en freezing ou fuit lorsque les USV sont jouées et explore moins le haut-parleur que si aucun son n'est joué (Brudzynski and Chiu 1995; Beckett et al. 1997; Sales 1991; Wöhr and Schwarting 2007). Il est intéressant de noter que le receveur montre des signes de peur à une nouvelle situation dans laquelle il est exposé à des vocalisations à 22 kHz seulement si il a déjà eu peur lui-même (Kim et al. 2010). La capacité à faire du freezing en réponse à des vocalisations de 22 kHz est conditionnée à une expérience préalable d'émission d'USV en contexte menaçant par le receveur. La réponse de freezing aux USV semble donc être une réponse issue d'un « auto-conditionnement » du rat (Parsana et al. 2012b). Enfin, les USV à 22 kHz lorsqu'ils sont utilisés comme SC génèrent des réponses de défense de manière privilégiée chez le receveur : un rat conditionné par une association USV 22 kHz – choc présente une réponse conditionnée aux USV à 22 kHz plus importante pendant le test de rétention que si un autre son est utilisé et le souvenir est plus résistant à l'extinction qu'avec d'autres stimuli ultrasoniques (Endres et al. 2007).

Enfin, les USV à 22 kHz lorsqu'ils sont rejoués, induisent chez le receveur l'activation de structures impliquées dans le comportement de défense telles que l'amygdale, la substance grise périaqueducale, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et le cortex perirhinal (Beckett et al. 1997; Allen et al. 2007; Sadananda et al. 2008).

Les vocalisations de 22 kHz semblent donc bien signifier au rat qui les entend un état émotionnel négatif de l'émetteur, et servir de signal d'alarme pour le receveur.

b. Les vocalisations à 50 kHz

Les vocalisations à 50 kHz, contrairement aux vocalisations à 22 kHz, semblent transmettre un état émotionnel positif, de recherche de contact social : les vocalisations à 50 kHz lorsqu'elles sont rejouées en play-back entrainent une activation du rat receveur ainsi qu'une approche des haut-parleurs (Wöhr and Schwarting 2007; Seffer et al. 2014). Cet effet est plus prononcé chez le jeune que l'adulte, mais le rat adulte « répond » à l'enregistrement en émettant à son tour des vocalisations à 50 kHz (White et al. 1993; Wöhr and Schwarting 2007). Ces vocalisations serviraient donc à établir un contact entre congénère et l'absence de vocalisation de la part d'un rat affecte son interaction avec ses congénères. Par exemple, un jeune rat passera plus de temps avec un adulte qui vocalise à 50 kHz qu'avec un adulte qui vocalise moins (Panksepp et al. 2002). Dans le cas du comportement sexuel, les vocalisations du mâle encouragent la femelle à adopter des comportements réceptifs (lordose, mouvements rapides,…) et à rester immobile lorsque le mâle engage l'accouplement. La dévocalisation des mâles diminue ces comportements chez la femelle (Mcintosh et al. 1978; Thomas et al. 1981; White and Barfield 1990). Les USV à 50 kHz pourraient signifier en particulier le caractère non agressif du contact recherché. En effet, au cours du jeu elles sont émises principalement avant une attaque, semblant signaler la volonté de jouer, et le temps passé à jouer est diminué lorsque les deux jeunes de la paires sont dévocalisés (Himmler et al. 2014; Kisko et al. 2015b, 2015a). Pour le receveur, ces USV ont valeur de récompense : en effet ils peuvent servir de renforcement dans un conditionnement opérant (Burgdorf et al. 2008).

Il a également été montré que l'écoute de vocalisations à 50 kHz entraîne une diminution de l'activité de l'amygdale (Parsana et al. 2012a) ainsi qu'une activation du noyau accumbens (Sadananda et al. 2008). Le noyau accumbens est considéré comme une structure clé dans les processus motivationnels. En particulier, il est modulé par des afférences dopaminergiques, afférences critiques dans le traitement des récompenses. Willuhn et al (2014) ont montré que la présentation de ces USV entraîne des libérations de dopamine dans le noyau accumbens, ce qui renforce l'idée que les USV à 50 kHz sont des signaux gratifiants pour le rat receveur.

En résumé, chez l'adulte, les USV véhiculent des informations sur l'état émotionnel de l'individu qui les émet et peuvent servir de signal de communication pour l'animal qui les reçoit: les USV à 22 kHz servent de signal d'alarme alors que ceux à 50 kHz sont impliqués dans la cohésion sociale. Ces deux types d'USV sont reconnus par les rats receveurs et peuvent modifier son état émotionnel et son comportement.

2. Chez le raton : effet sur la mère

Les vocalisations de 40 kHz du raton semblent jouer un rôle crucial dans sa survie : elles génèrent la recherche du raton par la mère lorsque celle-ci les perçoit (Allin and Banks 1972; Brunelli et al. 1994; Hashimoto et al. 2001; Smotherman et al. 1974). Par ailleurs, elles favorisent différents types de comportements maternels liés aux soins de la portée: le comportement de léchage ano-génital du raton (Brouette-Lahlou et al. 1992), la production de prolactine maternelle (Hashimoto et al. 2001; Terkel et al. 1979), la construction d'un nid (Hashimoto et al. 2001), le retour au nid si la mère s'en était éloignée (Jans and Leon 1983), et le transport de l'ensemble de la portée vers une zone plus sûre lorsque le nid est compromis (Brewster and Leon 1980). Par conséquent, l'émission de vocalisations par le raton semble intervenir à de nombreuses reprises dans les interactions mère-raton et favoriser sa survie dans un environnement hostile.

Ces comportements maternels peuvent être dépendants de la modulation fréquentielle des USV du raton : ainsi des ultrasons artificiels de 40 kHz de fréquence non modulée ne favorisent pas l'approche du haut-parleur par la mère (Wöhr and Schwarting 2008).

Du côté du receveur, père ou mère, le comportement de récupération et retour au nid en réponse aux appels du raton est conditionné à une expérience de soin préalable : alors que ni les mâles ni les femelles inexpérimentés ne ramènent un petit qui vocalise au nid, les animaux mis au contact de jeunes pendant plusieurs jours le font (Ehret et al. 1987). Cette capacité à percevoir les ultrasons des jeunes comme un signal attendant une réponse comportementale de soin est liée à une activation particulière des neurones du cortex auditif qui pourrait être liée, chez les femelles, à l'importante libération d'oxytocine lors de la naissance et de la lactation (Cohen et al. 2011; Ehret 1987; Liu and Schreiner 2007; Liu et al. 2015; Marlin et al. 2015; Rothschild et al. 2013).

Publication 2

***Objectif de la deuxième étude de thèse** : Lorsqu'un rat est soumis à une situation aversive, il émet des vocalisations ultrasoniques. Ces USV ont été beaucoup étudiées chez le raton dans le contexte de la recherche sur les anxiolytiques (Insel et al. 1986; Branchi et al. 2001; Simola 2015) mais leur caractérisation a été principalement faite en termes de taux d'émission en réponse à un isolement, le caractère aversif de la situation étant alors manipulé par la température ambiante. Si un tel paradigme a largement contribué à notre compréhension actuelle des USV du raton, il n'est pas utilisable à l'âge adulte et ne permet donc pas de comprendre l'ontogenèse des USV. Nous avons donc cherché à caractériser les USV du raton à des situations aversives plus variées que le seul isolement et à comparer les USV émises tout au long de la vie de l'animal en réponse à un choc électrique.*

Cette étude a été menée en collaboration avec le laboratoire de Regina Sullivan, Regina Sullivan ayant grandement contribué à l'élaboration de l'expérience de maltraitance maternelle. Millie Rincón-Cortes, une de ses doctorantes à l'époque, est venue 2 semaines au laboratoire dans le cadre de cette étude pour partager son expertise concernant la réponse comportementale immédiate des ratons au choc électrique. Les analyses des USV ont été réalisées grâce à des scripts en Python écrits par Samuel Garcia (pour l'intégration dans la base de données, la synchronisation avec la respiration et le comportement, et les conseils pour les autres analyses) et moi-même. Benjamin Bertrand est venu une semaine au laboratoire pour participer à la réflexion sur les scripts ce qui a permis *a posteriori* l'élaboration des histogrammes 2D de la fréquence des USV en fonction de leur durée. David Meunier a également largement contribué à la réflexion sur les outils statistiques à utiliser pour comparer des fonctions de probabilité de densité et l'algorithmie nécessaire à leur développement (utilisé dans la discussion générale de la thèse).

L'étude commence par une analyse qualitative des vocalisations émises par le raton lorsqu'il est isolé : contrairement à ce qui est majoritairement décrit dans la littérature, nous n'observons pas un seul type d'USV de fréquence centrée autour de 40 kHz chez le raton isolé, mais 2 types bien distincts. Le premier type semble correspondre aux USV classiquement décrites (35-45 kHz), de forme principalement monotone sur un spectrogramme. Nous les appellerons les USV *low frequency* ou LF. Le second type présente une fréquence plus élevée (60-80 kHz), une durée bien plus courte et une forme de point ou de virgule. Nous les appellerons les USV *high frequency,* ou HF). Nous avons ensuite recherché comment ces deux types d'USV d'isolement étaient modulées en présence d'une mère maltraitante : le taux d'USV LF est potentialisé pas les mauvais traitements maternels alors que celui des USV HF est seulement maintenu. Les USV du raton sont ensuite comparées aux USV émises par des rats juvéniles avant sevrage (PN22-24) et adultes en réponse à un même stimulus aversif artificiel, un choc électrique. Cette expérience permet de mettre en évidence des modifications ontogéniques des USV en termes de fréquence et de durée, ainsi qu'en ce qui concerne le lien qui les unit à la respiration et au comportement de l'animal. Enfin cette étude permet également de souligner que les USV LF et HF sont modulés de façon différente par l'aspect prédictif du choc.

Ces données suggèrent que les deux types d'USV émises par le raton pourraient transmettre un contenu informationnel différent, adapté aux caractéristiques de la situation aversive.

Cette étude a donné lieu à la rédaction d'un manuscrit en vue de soumission pour publication :

Boulanger Bertolus J, Rincon-Cortes M, Sullivan RM, Mouly A-M. Infant rat ultrasonic vocalizations: two kinds of cries for two different functions? (in preparation)

Infant rat ultrasonic vocalizations: two kinds of cries for two different meanings?

Julie Boulanger Bertolus[1], Millie Rincon-Cortes[2], Regina M. Sullivan[2], Anne-Marie, Mouly[1]

[1] Lyon Neuroscience Research Center, INSERM U1028; CNRS UMR5292; University Lyon1, Lyon, France

[2] Emotional Brain Institute, Nathan Kline Institute, Child and Adolescent Psychiatry, New York University School of Medicine, New York, NY, USA

Running title: Two kinds of cries in rat pups

Key words: ultrasonic vocalizations, respiration, freezing, infant rats, ontogeny

Acknowledgement: This work was supported by CNRS-PICS program (JBB, AMM, RMS), Partner University Fund Emotion & Time (JBB, AMM, RMS), LIA CNRS-NYU LearnEmoTime (JBB, MRC, AMM, RMS), NIH-DC009910, NIH-MH091451. This work was performed within the framework of the LABEX CORTEX (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR) (JBB, AMM). The authors gratefully acknowledge Ounsa Ben-Hellal for taking care of the animals.

Conflict of interest: All authors have no financial disclosures and/or conflicts of interest to disclose

ABSTRACT

All along their life, rats emit ultrasonic vocalizations (USVs) when confronted to an aversive situation: pups emit USVs at about 40 kHz while adults have been shown to vocalize at 22 kHz. However, the experimental conditions classically used to elicit USVs vary greatly with the animal's age. Pups' USVs are mainly studied in response to isolation from the dam and the nest and adults' USVs in response to nociceptive stimulation or aggressive social interaction. Such discrepancies preclude the comparison of vocal production at different developmental ages. In the present study, we aimed at better characterizing infant USVs in response to situations with increasing levels of stress and to compare these infant USVs with those observed in juvenile and adult rats using similar paradigms. For this, we first exposed pups to two natural aversive events: isolation and exposure to maternal maltreatment. This allowed us to describe two kinds of USVs in infant rats: high (60-80 kHz) and low (35-45 kHz) frequency USVs which are differentially modulated by the aversiveness of the context. We then exposed infant, juvenile and adult rats to the same aversive stimulus (footshock) and compared the USVs emitted at all ages, in terms of their frequency and duration, of their link with animal's respiration and behavior, and of their modulation by the predictability of the aversive event. This allowed us to show that the two types of infants USVs presented both similarities and differences with juvenile and adult USVs, in terms of their sensitivity to footshock as well as in their relation with respiration and behavior. We suggest that the high frequency infant USVs characterized in the present study may add information to the communicative signal sent by the pup in response to an aversive event.

INTRODUCTION

Rats and other rodents have developed communication in the ultrasonic range of sound frequencies. Adult rats emit two types of ultrasonic vocalizations (USVs). Long 22-kHz vocalizations are observed in aversive situations such as male-male aggression and social defeat (Sales 1972; Vivian and Miczek 1993), exposure to predator (Blanchard et al. 1991) or inescapable painful stimuli (Borta et al. 2006). They are thought to reflect a negative affective state of the animal (Knutson et al. 2002). In contrast, rats emit short 50-kHz vocalizations in positive situations as induced by social play (Knutson et al. 1998, 2002), during sexual interactions (White et al. 1990) or when tickled by an experimenter (Panksepp and Burgdorf 2000). 50-kHz vocalizations are thus considered as an index of a positive affect (Knutson et al. 2002). In addition, both 22-kHz and 50-kHz vocalizations likely convey communication information about the emotional state of the vocalizing rat. Indeed playback of 22-kHz USVs were shown to induce a reduction in locomotor activity in the receiver rat (Brudzynski and Chiu 1995; Wöhr and Schwarting 2007), suggesting 22-kHz USVs may serve as warning and alarm calls for conspecifics (Blanchard et al. 1990; Brudzynski 2013; Litvin et al. 2007). In contrast, playback of male prosocial 50-kHz USVs induce high levels of social approach behavior in female rats (Willadsen et al. 2014), supporting the conclusion that 50-kHz USVs could to play an important role in increasing social proximity.

Ultrasonic vocalizations are also emitted by rat pups from the day after birth to the time of weaning (Noirot 1968; Sales 1972; reviewed in Hofer 1996; Hofer et al. 2001). Classically described infant USVs occur in the 40-70-khz range, and have been abundantly investigated within the context of isolation. Indeed separation of a single pup from its littermates and dam in a novel test chamber (isolation) elicits high rates of USVs in rat pups. Isolation is by far the most frequently used and potent eliciting stimulus in experimental studies. In addition, infant isolation USVs have been shown to elicit maternal retrieval responses (Smotherman et al. 1974) and to be inhibited by an unfamiliar male (Takahashi 1992). Moreover, playback of a vocalizing pup through speakers elicits the same approach behavior as do calls from a live pup (Noirot 1972; Sewell 1970). Thus, like in adult rats, rat pups USVs may function as communicative signals (Ehret 2005; Brudzynski 2005).

Most of the studies on ultrasonic vocalizations deal with either pups or adult rats and the classical protocols for USVs induction used at the different ages are clearly different with mainly maternal separation protocols in infants and shock delivery (22-kHz USVs) or social interaction (50-kHz) in adults. Therefore little is known about how the transition between these vocalizations occurs with development.

Infant USVs are classically referred to as 40-kHz USVs because the frequency with peak energy is approximately 40 kHz, thus leading many authors to use bat detectors tuned to 40-50 kHz or bandpass filters centered around these frequencies (Allin and Banks 1971; Amsel et al. 1977; Blumberg et al. 1992; Gardner 1985; Hodgson et al. 2008; Hofer and Shair 1978; Ise and Ohta 2009; Noirot 1968; Oswalt and Meier 1975; Shair et al. 2012; Takahashi et al. 1991; Weber et al. 2000). However using the broadband output signal, Brudzynski et al (1999) reported that 10- to 17-day-old rat pups were capable of emitting sounds within the range of 90-130 kHz.

The aim of the present study was twofold. We first aimed at better characterizing infant USVs characteristics (frequency, emission rate) in response to situations with increasing levels of stress. For this, we exposed pups to two kinds of natural aversive contexts: isolation and exposure to a maltreating mother. We then exposed pups to an artificial aversive event classically used in adult rats: footshock delivery. This allowed us to describe two kinds of USVs in infant rats: high and low frequency

USVs which are differentially modulated by the aversiveness of the context. The second aim of the study was to compare the characteristics of these infant USVs with those observed in juvenile and adult rats using the same controllable aversive stimulus (footshock) at all ages. More specifically we carried out an in depth analysis of the USVs intrinsic parameters (frequency and duration), of their link with animal's respiration and behavior, and of their modulation by the predictability of the aversive footshock.

RESULTS

TWO KINDS OF USVS COEXIST IN INFANTS

1. Isolation

The pups were taken from their litter and placed in a cage without bedding in a temperature-controlled experimental room for a 5 min recording period. On the 6 recorded pups, 5 produced isolation USVs calls during this isolation period. Under visual inspection (**Figure 1**), it occurred that Infants USVs can be classified in two categories, with a first class of USVs around 40 kHz (referred to as 'Low Frequency' or 'LF USVs' in this manuscript) and a second class in the 60-80 kHz range (referred to as 'High Frequency' or 'HF USVs').

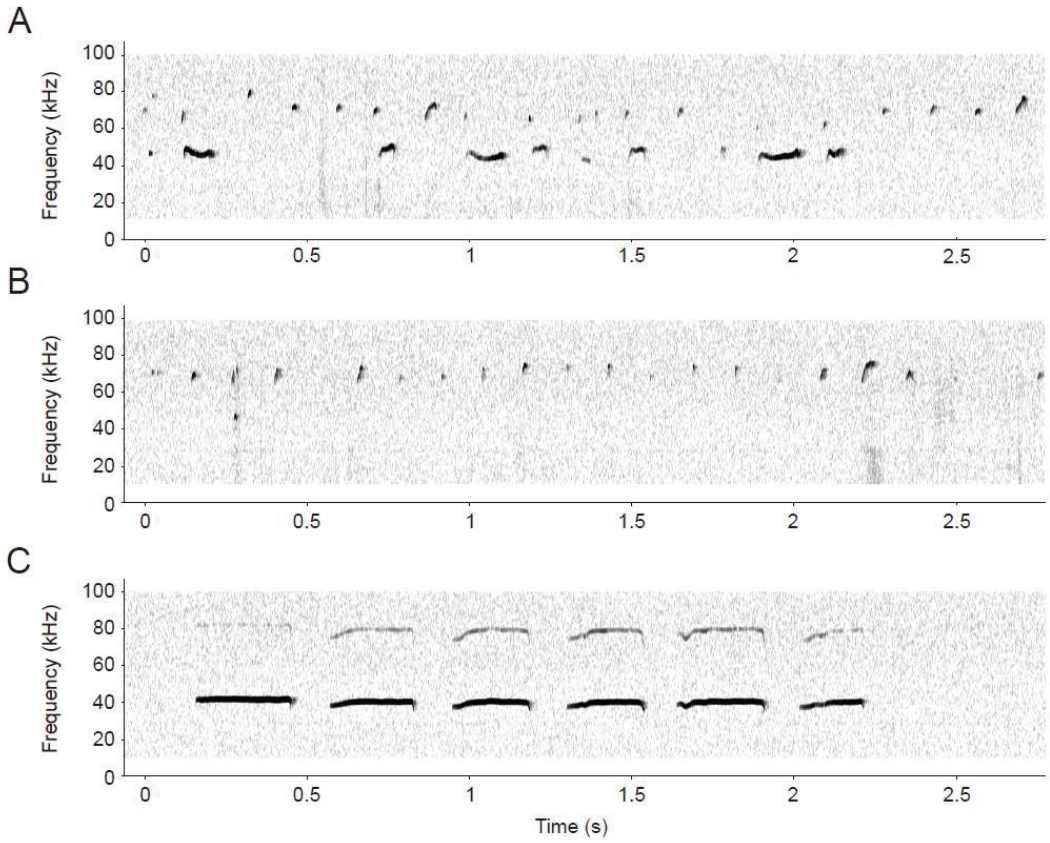


Figure 1: *Two types of isolation USVs are observed in infant rats. They can either co-occur (A) or be emitted by bouts of HF USVs (B) and LF USVs (C). Some harmonics may be visible on the spectrogram when LF USVs are emitted.*

The LF USVs presented mostly a flat shape, while the HF USVs presented a rising sweep or dot shape and a much shorter duration than LF USVs. The two types of USVs can either co-occur (**Figure 1**A), or happen at different moments (**Figure 1**B,C).

2. Modulation by maternal maltreatment

In this experiment, we assessed whether maltreatment by the mother was able to modulate the emission of both types of Infant USVs. The paradigm included 3 recording periods. Following a 5-min isolation in a cage without bedding in the experimental room (Isolation 1), the mother was introduced during 5 min (Mother) after which she was removed and the pup remained for an additional 5 min period (Isolation 2). Visual inspection of the mother's behavior verified that in this impoverished environment, the mother maltreated her pup, either actively by rough transport or stepping on them, or passively, by denying them retrieval when the pup called or by avoiding the pup when it was close to her. Very little grooming or nursing was observed during this 5 min mother-pup interaction. This group was compared to a control group in which the pups were left alone during the three 5 min periods.

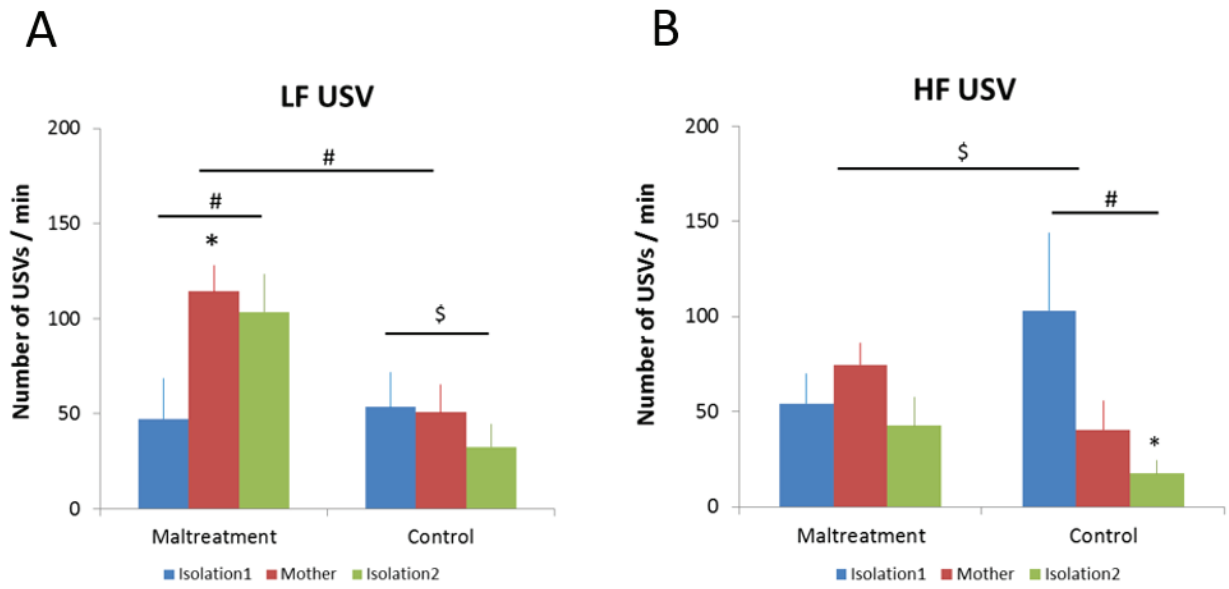


***Figure 2**: Interaction with a maltreating mother triggers a burst of LF USVs compared to baseline levels and prevents the decrease in HF USVs rate observed in control pups throughout the session. #: $p < 0.05$ for the ANOVA; $: $p < 0.1$ for the ANOVA.*: $p < 0.05$ compared to baseline.*

HF and LF USVs rats were analyzed separately. Concerning the LF USVs (**Figure 2**A), the ANOVA showed a significant Group effect and a significant Period x Group interaction, as well as a tendency for a Period effect [Group: $F(1,10) = 5.10$, $p = 0.048$; Period: $F(3,20) = 3.20$, $p = 0.062$; Group x Period: $F(2,20) = 5.62$; $p = 0.012$]. Further analysis showed a significant Period effect in the Maltreated group and a tendency for a Period effect in the Control group [Maltreatment: $F(2,10) = 4.48$, $p = 0.041$; Control: $F(2,10) = 3.82$, $p = 0.059$]. Post-hoc analyses showed that maltreatment by the mother induced an increase in LF USVs rate ($p = 0.046$).

Concerning HF USVs (**Figure 2**B), no Group effect was shown (*F*s < 1) but tendencies for a Period effect and Group x Period interaction was seen [Period: $F(2,20) = 3.10$, $p = 0.067$; Group x Period: $F(2,20) = 2.71$, $p = 0.091$]. Interestingly, post-hoc analyses suggested that maternal maltreatment prevented the decrease in HF USVs rate observed in the control group [Maltreatment group: $F < 1$; Control group: $F(2,10) = 5.62$, $p = 0.023$]. Further analysis showed that in this latter group, USVs rate showed a tendency to decrease during the second 5 min period compared to baseline (p = 0.076) to reach significant levels at the end of the session ($p = 0.046$).

Overall, this experiment showed that maltreatment of the pup by the dam triggered an increase in the amount of LF USVs, and prevented the decrease in HF USVs rate observed in control animals throughout the recording session.

3. Response to shock

Mild electric foot-shocks are a reliable experimental way to elicit USVs in adult rats, allowing control over the USVs inducing stimulus. In this experiment we assessed the impact of unpredictable foot-shock delivery on USVs emission rate in infants. Rat pups were isolated in the experimental cage kept at age-depended thermo-neutral temperature and submitted to 10 foot-shocks throughout a 45-min session (Foot-shock group). Their USVs emission rate was compared to that of control pups left in the experimental cage (Control group) for an equivalent amount of time.

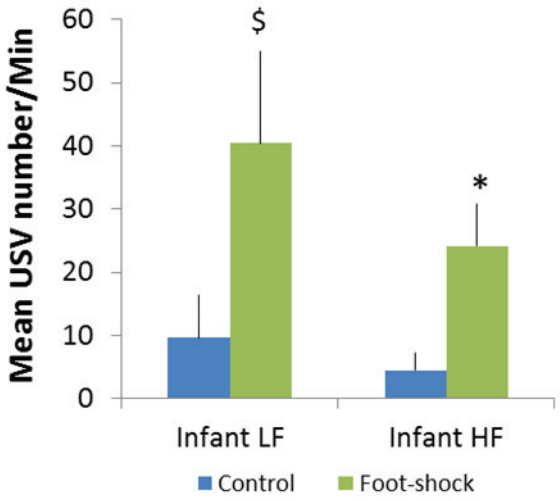


Figure 3: *Foot-shock delivery increases HF and LF USVs rate in infants. * p < 0.05 compared to control. $ p = 0.056 compared to control.*

A two way ANOVA with Group as independent factor and USVs Frequency as repeated measure showed a significant effect of Group [$F(1,14) = 5.75$, $p = 0.03$] and of Frequency [$F(1,14) = 4.97$, $p = 0.043$] but no significant Group x Frequency interaction [$F(1,14) = 1.33$, ns] . Further analysis showed that both HF and LF USVs emission rates were significantly increased by foot-shock delivery compared to isolation alone ($p = 0.01$ for HF USVs; $p = 0.056$ for LF USVs).

In summary, this series of experiments allowed us to highlight the existence of two types of USVs in infants, HF and LF USVs. Both types are observed in response to isolation from the mother. LF USVs are further increased in response to maternal maltreatment or foot-shock delivery, while HF USVs are only increased by foot-shock delivery (**Table 1**).

Table 1: *Consequences of two aversive experimental conditions (Maternal Maltreatment and Foot-shock) on infant USVs emission rate compared to baseline isolation levels.*

	Infant USVs	
USVs type	**HF**	**LF**
Maternal Maltreatment	Same	Increase
Foot-shock	Increase	Increase

USVs CHARACTERISTICS THROUGH ONTOGENY

In order to compare the infant USVs to those recorded at older ages, we used the same aversive stimulus (foot-shock) in three groups of age: Infant (PN12-15), Juvenile (PN22-24) and Adult (over PN75), and studied the characteristics of the USVs recorded in these experimental conditions. Rats were isolated in the experimental cage kept at age-depended thermo-neutral temperature and submitted to 10 foot-shocks throughout a 45-min session. In such conditions, 7/7 infants, 5/7 juveniles and 7/8 adults emitted more than 50 USVs in the session and were kept for further analysis. Three parameters were considered for between age's comparisons: USVs frequency and duration, link with respiration and link with behavior.

1. USVs Frequency and duration

The USVs varied greatly in frequency and duration during ontogeny (**Figure** 4A).In adult and juvenile rats, USVs are characterized by a main frequency and duration, while in infants, as already described above, two classes of USVs are observed (**Figure** 4B). This is further confirmed when considering frequency distribution (see **Figure** 4C): while a unimodal curve was observed in juveniles and adults, infants USVs frequency exhibited a bimodal distribution. More specifically, in adult animals, USVs frequency peaked between 20 and 25 kHz (mean ± SEM: 22.6 ± 0.3 kHz) and their duration was widely spread between 400 and 2000 ms (900 ± 100 ms) (**Figure** 4D). In juvenile rats, the USVs presented a slightly higher frequency, peaking at about 30 kHz (29.7 ± 0.5 kHz) and lasted less, 250 to 750 ms (450 ± 40 ms). In infants LF USVs frequency peaked between 35 and 45 kHz (40.5 ± 0.6 kHz) and the USVs lasted for around 200 ms (140 ± 10 ms). The infants' HF USVs frequency peaked between 60 and 80 kHz (66.4 ± 1.2 kHz) and had very short durations (21 ± 2 ms).

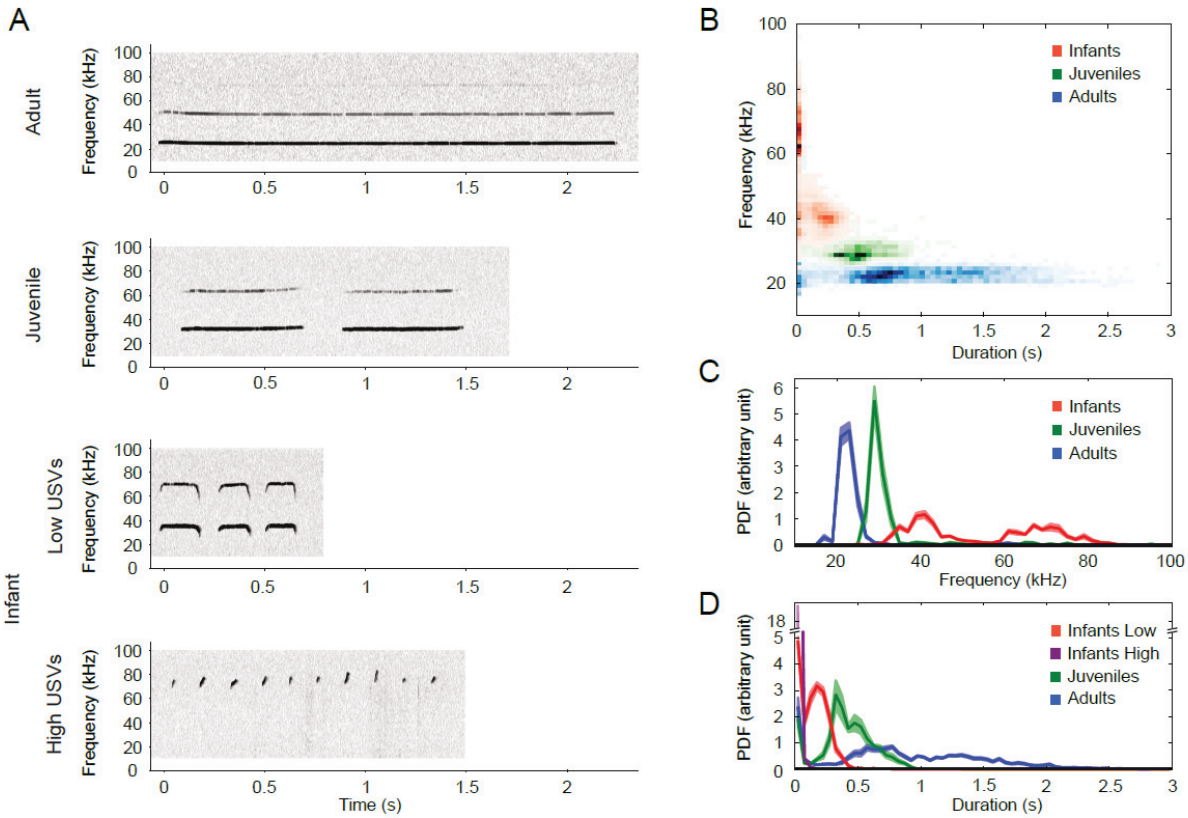


Figure 4: USVs frequency and duration as a function of age. A. *Individual examples of USVs at all ages.* ***B.*** *The frequency and duration of each USVs are measured and a 2-dimensional Probability of Density Function (PDF) is calculated over all the USVs of the age group. The intensity of the color represents the amount of USVs with the corresponding frequency and duration.* ***C.*** *PDF of USVs frequency.* ***D.*** *PDF of USVs duration.*

2. Link with respiration

We then examined the relationship between each USVs call and the respiratory signal. Indeed, vocalizations are emitted during the expiratory phase of the respiratory cycle. In adult and juvenile rats (**Figure** 5A, upper part), USVs emission modified greatly the shape of the respiratory signal. However, this alteration of the respiratory signal is not or less visible during infant vocalizations (**Figure** 5A, lower part). Moreover, in infants, while LF USVs lasted for the whole expiratory cycle duration, as seen in adults and juveniles, HF USVs were shorter in duration than the expiration. Formal comparison of the duration of the calls and of the expiratory phase confirmed good correlation between the two for adult, juvenile and infant LF USVs (**Figure** 5B; Adult: $r = 0.80$, $n = 3945$; Juvenile: $r = 0.49$, $n = 1927$; Infant low USVs: $r = 0.55$, $n = 5479$) but not for the infant HF USVs ($r = 0.04$, $n = 3270$).

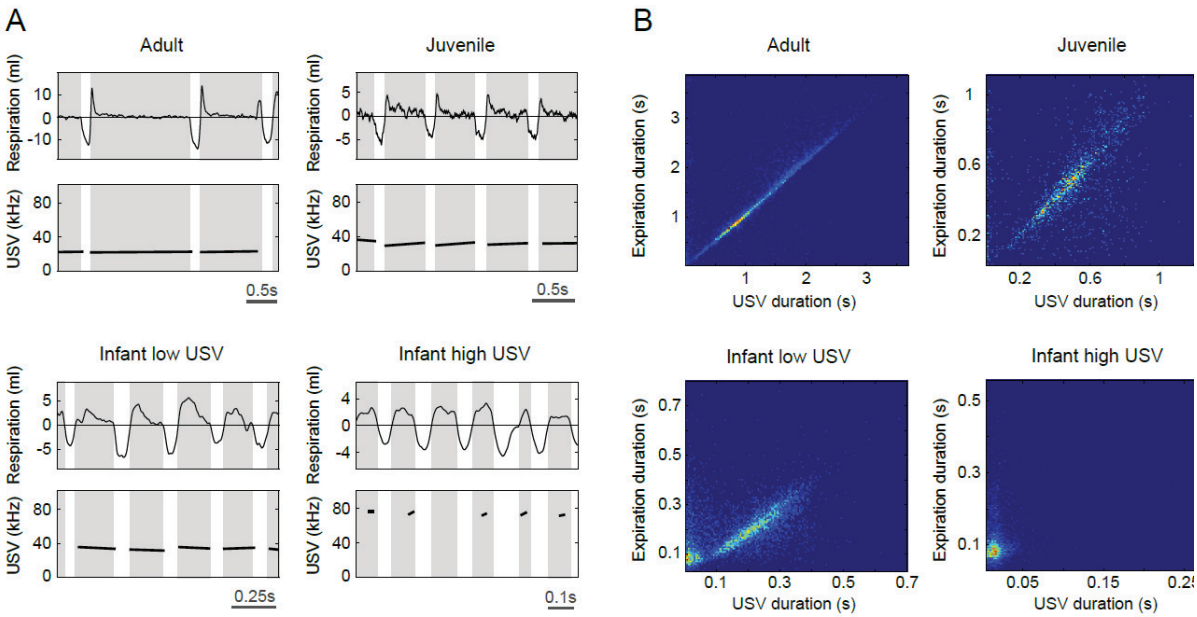


Figure 5: Link between expiration and USVs. A. *Individual examples of typical respiratory signals observed during ultrasonic vocalizations. For adults, juveniles and infants' LF USVs, the USVs last as long as the expiratory phase (grey) of the respiratory cycle. The infants' HF USVs, however, are shorter than the expiratory phase.* ***B.*** *Correlation between USVs duration and expiration duration at the different ages*

3. Link with behavior

In the context of shock delivery, the animals were either freezing or moving, no significant quiet immobility was observed. Therefore, we quantified the percentage of USVs emitted during movement vs freezing for each developmental age. As seen in **Figure 6**, in adults and juveniles most of the USVs were emitted during freezing. In contrast, in infants USVs were mainly observed during movement. The ANOVA confirmed a difference between ages and USVs type ($F(3,22) = 121.10$, $p < 0.001$). Further post-hoc analysis showed a significantly lower proportion of USVs during freezing in infants compared to older ages ($p < 0.001$). In addition, there was a significant difference between the two types of infants' vocalizations ($p = 0.01$): infant HF USVs were almost exclusively emitted during movement while a small amount of infant LF USVs occur during freezing.

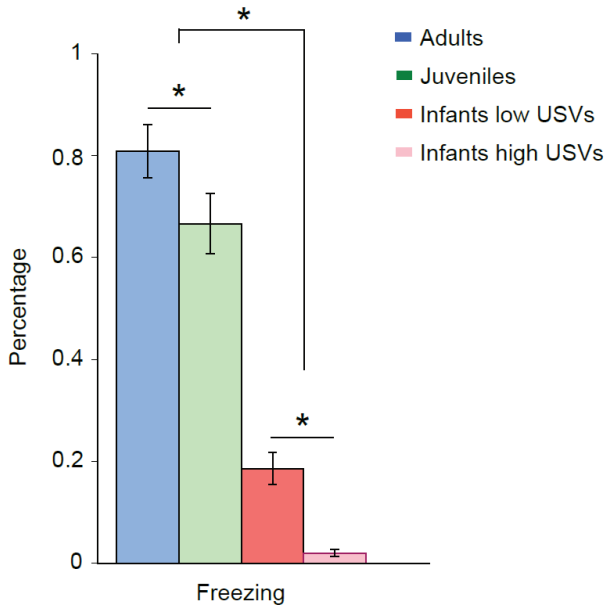


***Figure 6**: Percentage of USVs emitted when the rat is freezing at the different ages of development. *: p < 0.5.*

In summary the study of the characteristics of USVs at the three ages of development revealed clearcut differences between infant USVs and USVs at older ages (**Table 2**). Moreover, infant USVs can be divided in two categories: LF USVs which present some similarities with USVs observed in juvenile and adults, and HF USVs which seem apart.

***Table 2**: USVs characteristics as a function of age*

	Infant		Juvenile	Adult
USVs type	**HF**	**LF**	**LF**	**LF**
USVs Mean frequency (kHz)	66.4 ± 1.2	40.5 ± 0.6	29.7 ± 0.5	22.6 ± 0.3
USVs Duration (ms)	21 ± 2	140 ± 10	450 ± 40	900 ± 100
USVs vs Expiration duration	<	=	=	=
Main behavior during USVs	Movement	Movement	Freezing	Freezing

USVs EMISSION RATE IS DIFFERENTIALLY MODULATED BY SHOCK PREDICTABILITY THROUGH ONTOGENY

In this last experiment, we wanted to assess to what extent USVs emission rate is responsive to changes in environmental input. For instance, predictability of an aversive event is known to modulate the level of anxiety in the animals. We therefore compared USVs emission rate in response to foot-shock in two experimental conditions: Unpredictable versus Predictable Odor-Cued foot-shock, at the different ages of development. In infant rats, HF USVs emission rate was significantly lower in the Predictable condition than in the Unpredictable group. [$F(1,15) = 4.67$, $p = 0.047$]. Concerning LF USVs, a two way ANOVA with Group and Age as independent factors revealed a significant difference for Age [$F(2,50) = 5.25$, $p = 0.009$], but no significant difference for Group [$F(1,50) = 1.27$, *ns*] nor for

Group x Age interaction [$F(2,50) = 2.56$, *ns*] (**Figure 7**). Thus shock predictability significantly decreased the rate of infant HF USVs, while leaving unchanged the rate of LF USVs at the three ages.

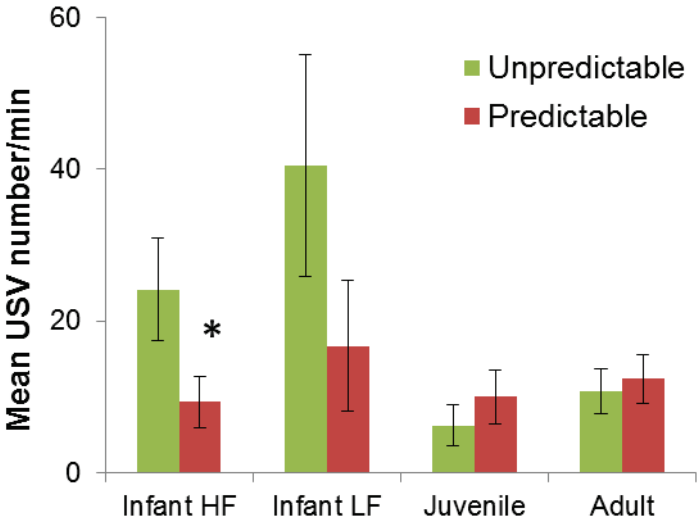


Figure 7: Effect of shock predictability on USVs emission rate. *Predictable odor-cued foot-shock delivery induces lower rate of HF USVs in infants compared to Unpredictable foot-shock. LF USVs rates were not significantly different when comparing Predictable vs Unpredictable foot-shock conditions at all ages of development. * p < 0.05 compared to unpredictable foot-shock*

DISCUSSION

The main result of the present study is the identification and characterization of two types of USVs in infant rats based on their frequency and duration: HF short duration (Mean values: 66 kHz, 21 ms) and LF long duration (40 kHz, 140 ms). Both types of USVs are observed in response to isolation from the mother. We showed that different kind of aversive situations differentially modulated these two USVs types. Indeed LF USVs rate was increased in response to maternal maltreatment and foot-shock exposure, while HF USVs are only increased by foot-shock delivery. Further investigation of their characteristics highlighted that LF infant USVs, like LF juvenile and adult USVs, last more than 100 ms and their duration matched the duration of the expiratory phase of the respiratory cycle, thus potentially impacting respiratory rate. In contrast HF USVs are much shorter than 100 ms and occur within small portions of the expiratory phase, with no apparent consequences on the respiratory rate. Finally we manipulated shock predictability and showed that when the shock is rendered predictable by an odor cue, the rate of infant HF USVs is decreased to baseline levels while the LF USVs rate is unchanged for the three tested ages.

NOVELTY OF THE STUDY

To our knowledge the present study is the first to provide an in depth characterization of two types of infant USVs observed both in natural stressful conditions as well as in response to an artificial stressor classically used in adults.

Most studies devoted to infant USVs investigation indicated that the major frequency of the USVs was distributed around 40 kHz, as detected mostly by pre-tuned bat detectors, or microphones using band-pass filters (Allin and Banks 1971; Amsel et al. 1977; Blumberg et al. 1992; Gardner 1985;

Hodgson et al. 2008; Hofer and Shair 1978; Ise and Ohta 2009; Noirot 1968; Oswalt and Meier 1975; Shair et al. 2012; Takahashi et al. 1991; Weber et al. 2000). However Noirot (1972) previously described two types of infant USVs mainly based on their duration: clicks (produced by very short pulses, transients or sweeps) and whistles (produced by pulses staying in tune at an almost constant frequency for more than 5 ms). Moreover Brudzynski et al (1999) reported that 10- to 17-day-old rat pups were capable of emitting sounds within the range of 90–130 kHz. Interestingly, Ise and Ohta (2009) assessed the impact of environmental stimuli or pharmacological treatment on the infant USVs frequency distribution. They showed that the USVs frequency distribution presented two distinct peaks between 30 kHz and 50 kHz, and that the high-frequency component was sensitive to stress induced by low ambient temperature, as well as activation of the CRF and GABAergic systems. Although the two types of USVs described here show slightly different mean frequencies (40 kHz and 66 kHz) they could correspond to those described by Ise and Ohta (2009).

MODULATION OF USVS RATE BY MATERNAL MALTREATMENT

In the first experiment, we isolated the pups and then exposed them to maternal maltreatment by introducing the mother in a cage without shavings. Such treatment triggers maternal stress that has proven to be powerful to induce abusive maternal behaviors (Gilles et al. 1996; Roth and Sullivan 2005). Our data show that both HF and LF USVs were observed during isolation, thus suggesting they are both reflecting pup's distress. Indeed, rat pups, like other mammalian infants, experience maternal separation as a stressful event, as measured by HPA axis responses and noradrenergic activity (Hennessy and Weinberg 1990; Hofer and Reiser 1969; Harvey and Hennessy 1995). Here we observed that exposure to maltreatment by the mother further increased the rate of LF USVs in pups compared to baseline isolation levels while HF USVs remained unchanged. These data suggest that LF USVs emission is more sensitive to maltreatment by the mother than HF USVs. We then compared the present effects with those induced by an artificial stressor currently used to induce 22-kHz USVs in adults and juveniles, namely electric foot-shock. This allowed us to compare USVs induced by the same stressor at different developmental ages.

MODULATION OF USVS RATE BY SHOCK DELIVERY

In adults and juveniles, 22-kHz USVs are classically observed in response to aversive events (predator encounter, agonistic interaction, noxious stimuli) and are considered as part of the animal's defensive repertoire (Brudzynski 2001). Considering 22-kHz USVs induced in response to foot-shock, it has been shown that in adult animals the likelihood of USVs occurrence (i.e., call rate, number of rats vocalizing) increased with increasing shock levels (Wöhr et al. 2005; Hegoburu et al. 2011). Therefore, it is assumed that these USVs reflect a negative affective state akin to anxiety and depression (Jelen et al. 2003; Tonoue et al. 1986). Little is known about the age at which these low frequency USVs occur and how they change with development, mainly due to the fact that very few studies have used the same protocol at different developmental ages.

In the present study we compared the characteristics of the USVs at three ages of development, in response to the same stressor: a mild foot-shock. At the three ages, LF USVs were observed in response to foot-shock. In infants, their rate was increased in response to shock compared to baseline isolation USVs, while in juveniles and adults, the LF USVs were triggered by shock delivery. Interestingly, the mean frequency of these LF USVs decreased from infants to adults. Riede (2013) shows that the geometry of the glottis explains most of the frequency modulations observed in adults. The decrease in USVs frequency with age could be linked to modifications of the glottis shape due to

the developmental increase in the size and length of the larynx and the vocal tract. Such a decrease in the mean frequency with age has been reported for rat pups (Elsner et al. 1990; Blumberg et al. 2000).

HF USVs were also enhanced in infants in response to foot-shock delivery, which suggests that like LF USVs, they reflect a negative affective state in pups. In adult and juvenile rats 50-kHz are observed in appetitive situations, such as rough-and-tumble play in juveniles and mating or in response to drugs of abuse in adults (for a review, see Wöhr and Schwarting 2013) and are assumed to reflect a positive affect. However, Vivian and Mickzek (1993) showed that during agonistic encounters two distributions of pure tone whistles were observed: long 20- to 32-kHz ("low") signals and short 32- to 64-kHz ("high") signals. This is in line with other studies showing that rats emit both 50-kHz and 22-kHz USVs during aggressive encounters such as resident-intruder tests, offensive behavior being mostly associated with short, high frequency calls (50-kHz USVs) and long low frequency calls (22-kHz USVs) being produced during defensive and submissive behavior (Sales 1972; Schouten 1988; Haney and Miczek 1994). Therefore infant HF USVs might be the infant analog of 50-kHz USVs observed at older ages during agonistic encounters. Since they were enhanced by footshock but not by maternal maltreatment, it might be suggested that LF and HF USVs are increased successively as the level of arousal (higher intensity, unexpected) induced by the stimulus increases, foot-shock being more arousing than maternal maltreatment.

Modulation of USVs rate by shock predictability

The defense response in rodents was shown to depend on the physical distance from a threat (Blanchard et al. 1993; Bolles and Fanselow 1980; Fanselow 1986). Blanchard et al (1993) distinguished between two types of defensive behaviors: fear and anxiety. Fear is elicited when the danger (ie a predator) is clear and imminent while anxiety is induced when the threat is uncertain or distal. In the laboratory, unpredictable shocks are known to trigger higher levels of anxiety than cued predictable shocks (Davis et al. 2010).

USVs were found useful for differentiating fear and anxiety in rats (Jelen et al. 2003). Indeed in a classical conditioning paradigm, danger stimulus, preceding unavoidable shock, is known to induce acute fear, whereas intertrial period evokes anxiety. Interestingly, sustained 22-kHz USVs were shown to occur preferentially between trials whereas acute fear induced by a signal of danger resulted in immediate inhibition of USVs (Frysztak and Neafsey 1991; Jelen et al. 2003; Shionoya et al. 2013). Here we assessed the effects of shock predictability on USVs emission rate. We showed that while LF USVs were unaffected by shock predictability at all ages of development, the rate of HF USVS in infants was decreased when the shock was signaled by an odor. The immediate inhibition of the USVs emission by the danger-signaling odor was thus too transient to induce a global reduction in LF USVs amount when comparing predictable vs unpredictable conditions in the present study in the three groups of ages. However, infant HF USVs rate was clearly lower in the predictable condition compared to the unpredictable one. This suggests that in predictable shock condition, infant HF USVs might rather show phasic increases as opposed to sustained increases observed for LF USVs.

Link between USVs emission and Behavior

A particularity of infant USVs is that they are emitted during movement, while in juveniles and adults, 22-kHz USVs are predominantly produced during freezing.

In adult rats, previous studies have shown that while immobility may occur without 22-kHz USVs, such USVs do not occur without immobility (Brudzynski and Ociepa 1992; Walker and Carrive

2003; Wöhr et al. 2005). USVs are vibrations caused when expired air is forced through a constricted larynx. Walker and Carrive (2003) suggested that USVs emission needs thorax immobilization, itself a component of the freezing posture whose role is to stabilize both the lower and upper parts of the trunk. This posture may allow a better use of the four limbs for an adapted optimal response to a danger.

In the present study, infant HF USVs were emitted almost exclusively during movement while LF USVs could be seen during immobility but to a lesser extent than during movement. This is in agreement with the data from the literature. Indeed, Wöhr and Schwarting (2008) showed that infant ultrasonic calling was highly correlated with locomotor activity, especially in case of pivoting behavior (number of 360° rotations). Hofer (1996) suggested that the circular pivoting locomotion of isolated rodent pups provides a means of projecting the ultrasonic "beam" over a wide directional range.

In adults, 50-kHz USVs are produced during locomotion since they occur during social interactions like rough-and-tumble play in juveniles (Knutson et al. 1998; Webber et al. 2012) and mating in adults (Sales (née Sewell) 1972; Barfield et al. 1979), and have also been described during feeding and moving (Takahashi et al. 2010), as well as during agonistic interactions (Schouten 1988; Vivian and Miczek 1993).

LINK BETWEEN USVS EMISSION AND RESPIRATORY SIGNAL

The production of rat ultrasonic calls is an active and dynamic process. Both ultrasounds and audible cries are normally produced at the onset of expiration (Roberts 1972). Coordinated brainstem mechanisms are involved in the preparation of the respiratory system and larynx. Rats first make an inspiration, the larynx is stabilized, and then vocal folds are tightly opposed leaving only a small opening through which forced expiration produces a whistle-like call (Roberts 1975; Sanders et al. 2001; Riede 2013). This forced expiratory effort involves sharp contraction of the abdominal musculature, and of the spinal extensor muscles (Hofer 1996). From this it ensues that there is a clear dependence of USVs production on breathing. Previous studies have indeed shown that in adult rats, there is a strong correlation between expiration duration and USVs duration for 22-kHz USVs (Frysztak and Neafsey 1991; Hegoburu et al. 2011).

Here we compared the relationship between USVs calls and respiratory cycles at the different ages of development. Concerning LF USVs, we confirmed that LF infant and juvenile like for adult USVs, last more than 100 ms and their duration matched the duration of expiration, thus potentially impacting respiratory rate. In contrast HF USVs are much shorter than 100 ms and occur within small portions of the expiratory phase, with no impact on respiratory frequency.

Little is known about the interplay between 50-kHz USVs and respiratory dynamics in adult rats, but a recent study by Sirotin et al (2014) showed that 50-kHz USVs production is largely restricted to periods of active sniffing. During these periods, calls are produced exclusively during exhalations and prolong sniffs causing an instantaneous reduction in sniff rate. Most calls are, however, brief, producing only a modest drop in sniff rate.

FUNCTIONAL INTERPRETATIONS

Two different types of rat pups vocalizations have been characterized in this study that are both emitted in response to isolation but can be differentially modulated depending on the experimental conditions. We suggest that this differential modulation might be linked to the intensity

of arousal triggered by the adverse event (see also Bell 1974 and ; Zeskind et al. 2011 for discussions), with a first tonic increase in LF USVs rate followed by phasic increases in HF USVs rate as the level of arousal further increases. These two types of vocalizations potentially reflecting the level of pup arousal could in turn differentially impact on maternal arousal and behavior as previously suggested by Bell (1974). For instance, it would be interesting to assess to which extent the behavior of the mother is modified by the playback of either LF USVs, HF USVs or a mix of LF and HF USVs. Interestingly, Rohitsingh et al. (2011) showed that maternally-potentiated infant USVs are better cues than isolation-induced USVs to induce maternal retrieval. Whether this effect is due to the difference in USVs rate or to changes in global frequency content as observed in the presence study would deserve further investigation.

When distressed or separated, human babies like infant rats, produce extensive vocalizations, including crying. Although any comparison between species needs to be conducted with extreme caution, and cries of human infants and rat pups are produced by very different physiological mechanisms, the translational assessment of infant vocalizations may contribute a better understanding of the effects of variations in the prenatal environment on infant neurobehavioral development (for a review, see Zeskind et al. 2011).

MATERIALS AND METHODS

ANIMALS

The subjects were male and female Long Evans rats born and bred at the Lyon Neuroscience Research Center (originally from Janvier Labs, France). Some of their respiratory recordings have been used in a previous study (Boulanger Bertolus et al. 2014). For pups, only one female and one male pup per litter per treatment/test condition were used for all experiments. Three groups of ages were used: post-natal day 12 to 15 (PN12-15, Infants), PN22-24 (Juveniles) and older than PN75 (Adults). Day of birth was considered PN0. Infant and juvenile animals were maintained with their litters up to the end of the experiments while adults were housed by pairs. All animals were housed at 23°C and maintained under a 12h light-dark cycle (lights on from 6:00 am to 6:00 pm). Food and water were available *ad libitum* and abundance of wood shavings was supplied for nest building. All animals were maintained at age-dependent thermo-neutral temperatures during experiments. All experiments were conducted in strict accordance with the European Community Council Directive of November 24, 1984 (84/609/EEC) and the French National Committee (87/848) for care and use of laboratory animals. Care was taken at all stages to minimize stress and discomfort to the animals.

MATERNAL MALTREATMENT EXPERIMENT

Testing paradigm

On the testing day, pups were brought to the experimental room warmed to 28-30°C in their home cage with their sleeping littermates, the dam being taken to another cage before transport. Testing started with the experimental pup being gently put into a clean empty cage (40 x 25 x 18 cm). Recording of the vocalizations emitted in response to this isolation was performed for 5min (Isolation1) after which the mother was put into the cage and recording of the associated vocalizations was

performed for 5min (Mother). The mother was removed and vocalizations to this second isolation were recorded for another 5min (Isolation2). Control pups underwent the same paradigm without the mother being taken to the experimental cage, which resulted in a 15min undisturbed isolation.

The USVs emitted by the pups throughout the session were recorded by a condenser ultra-sound microphone (Frequency range: 10 kHz-200 kHz, Avisoft-Bioacoustics CM16/CMPA, Berlin, Germany) positioned 30cm above the experimental cage.

USVs recording and analysis

The ultrasound microphone was connected to a recording interface (UltraSoundGate 116Hb, Avisoft-Bioacoustics) with the following settings: sampling rate = 214285 Hz; format = 16 bit (Wohr et al., 2005). Recordings were transferred to Avisoft SASLab Pro (version 4.2, Avisoft-Bioacoustics, Berlin, Germany) and a fast Fourier transform (FFT) was conducted. Spectrograms were generated with an FFT-length of 512 points and a time window overlap of 87.5% (100% Frame, FlatTop window). These parameters produced a spectrogram at a frequency resolution of 419 Hz and a time resolution of 0.29 ms. The acoustic signal detection was provided by an automatic whistle tracking algorithm with a threshold of −20 dB, a minimum duration of 4 ms and a hold time of 4 ms, to allow the detection of the smallest calls. Because these minimums duration and hold time are very permissive, the accuracy of detection was verified call by call by an experienced user.

USVs analyses in this study were restricted to the rats emitting more than 50 USVs throughout the session. The USVs recorded throughout the session were classified in two categories: LF (0-56 kHz) and HF (56-100 kHz). The number of USVs recorded in both categories during each 5min period was expressed per 1 min and compared between groups and periods using a two way ANOVA with group as an independent factor and period as a repeated measure, followed by *post-hoc* comparisons when allowed by the ANOVA results. Significance was set at $p < 0.05$.

FOOT-SHOCK EXPERIMENT

Experimental setup

The apparatus consisted of a whole body customized plethysmograph cage (diameter 20cm, Emka Technologies, France) for recording respiratory signal (see Hegoburu et al. 2011 for further description of the plethysmograph). The floor was equipped with a shock floor connected to a programmable Coulbourn shocker (Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf, Germany) and the ceiling of the cage was equipped with three Tygon tubings (diameter 3 mm) connected to a programmable custom olfactometer to deliver air and odorants when appropriate. The height of the plethysmograph was adapted to the age of the animal in order to optimize the signal-noise ratio, leading to a height from 16.5 cm for infants to 30 cm for the adults. The plethysmograph was placed in a sound-attenuating cage (L 70 cm, W 60 cm, H 70 cm). The behavior was recorded using four video camera placed at each corner of the sound-attenuating cage (B/W CMOS PINHOLE camera, Velleman, Belgium), and an homemade acquisition software using Matrox Imaging Library and acquisition card (Matrox video, UK). The USVs emitted by the rats were recorded by a condenser ultra-sound microphone (Avisoft-Bioacoustics CM16/CMPA, Berlin, Germany) inserted in the tower on the top of the plethysmograph cage.

Training paradigm

Adult rats were handled and placed into the conditioning chamber for context habituation for 20 min during the 4 days preceding the beginning of the experiment. Juveniles received only one day of handling and habituation while infants, for which conditioning to context is not yet developed (Raineki et al. 2010), were not handled to minimize distress from separation from the mother.

The aversive event applied at all ages consisted of a 1-s mild (0.4 mA) foot-shock delivered through the grid floor. Two experimental conditions were considered in which the footshock was either unpredictable or predictable by an odor cue (30-s peppermint odor; McCormick Pure Peppermint; 2 L/min; 1:10 peppermint vapor to air), the last second of which overlapped with the shock. During the first 10 min of the conditioning session, animals were allowed an adaptation period of free exploration. This was followed by 5 shocks, either unpredictable or predictable, with a 4 min inter-trial interval. Vocalizations, respiration and behavior were continuously monitored throughout the session. The animals were brought back to their home cage after the session.

Data acquisition and pre-processing

The USVs were recorded and analyzed as described above. USVs analyses were restricted to the rats emitting more than 50 USVs throughout the session.

The respiratory signal collected from the plethysmograph was amplified and sent to an acquisition card (MC-1608FS, Measurement Computing, USA; Sampling rate = 1000 Hz) for storage and offline analysis. Using whole body plethysmograph setup, natural breathing signal appears as a periodic phenomenon showing alternating negative (inspiration) and positive (expiration) deflections. The detection of respiratory cycles was achieved using an algorithm described in a previous study (Roux et al. 2006). This algorithm performs two main operations: signal smoothing for noise reduction, and detection of crossing zero points in order to define accurately the inspiration and expiration phase starting points. Artifacts were eliminated by determining a cut-off value for signal duration (see Hegoburu et al. 2011 for further description). Momentary respiratory frequency was determined as the inverse of the respiratory cycle (inspiration plus expiration) duration.

The video signal collected through the four video cameras was acquired with homemade acquisition software using the Matrox Imaging Library and a Matrox acquisition card (Morphis QxT 16VD/M4, Matrox video, UK).The animal's freezing behavior was automatically detected using a LabView homemade software that had been validated by comparison to hand scoring by an experimenter blind to the rats' condition. Definition of the freezing at the different ages followed the methods defined by Takahashi (1992) and takes into account the immaturity of infants' musculoskeletal system.

The different data (respiration, USVs, behavior) were then entered in a database (Garcia and Fourcaud-Trocmé 2009). The first step of data analysis was data synchronization. This was achieved via a TTL synchronization signal generated at the beginning of each experimental session. Secondary TTL signals were also generated for important events in the session: shock delivery, odor arrival. Once synchronized, the data were analyzed using scripts in Python.

USVs analysis

USVs Characteristics: The frequency and duration of the vocalizations were analyzed by defining their probability of density function (PDF) for each animal using a bin of 2 kHz for the frequency and 0.1 s for the duration. The PDFs were then averaged within conditions and the standard error determined for each point.

USVs versus Behavior: the behavioral data corresponding to each USVs call were extracted and their category (Freezing or Movement) examined. This allowed us to determine in which behavioral state the USVs occurred preferentially. Differences were tested using Student t-tests.

USVs versus Respiration: because it rapidly occurred that USVs emission has a strong impact on respiration, the respiratory signal corresponding to each USVs call was extracted and analyzed. Specifically, the duration of expiration phase during each call was examined and correlated to the duration of the call.

Shock predictability effect: The number of USVs recorded when the rats received shocks was expressed per 1 min and compared between groups (Unsignaled vs. Signaled footshock and Age) using a two way ANOVA with independent factors, followed by *post-hoc* comparisons when allowed by the ANOVA results. Significance was set at $p < 0.05$.

REFERENCES

Allin JT, Banks EM. 1971. Effects of temperature on ultrasound production by infant albino rats. *Dev Psychobiol* **4**: 149–156.

Amsel A, Radek CC, Graham M, Letz R. 1977. Ultrasound emission in infant rats as an indicant of arousal during appetitive learning and extinction. *Science* **197**: 786–788.

Barfield RJ, Auerbach P, Geyer LA, Mcintosh TK. 1979. Ultrasonic Vocalizations in Rat Sexual Behavior. *Am Zool* **19**: 469–480.

Bell RW. 1974. Ultrasounds in small rodents: Arousal-produced and arousal-producing. *Dev Psychobiol* **7**: 39–42.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Agullana R, Weiss SM. 1991. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* **50**: 967–972.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM. 1990. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **14**: 463–472.

Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC. 1993. Defense system psychopharmacology: An ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behav Brain Res* **58**: 155–165.

Blumberg MS, Efimova IV, Alberts JR. 1992. Ultrasonic vocalizations by rat pups: The primary importance of ambient temperature and the thermal significance of contact comfort. *Dev Psychobiol* **25**: 229–250.

Blumberg MS, Sokoloff G, Kent KJ. 2000. A developmental analysis of clonidine's effects on cardiac rate and ultrasound production in infant rats. *Dev Psychobiol* **36**: 186–193.

Bolles RC, Fanselow MS. 1980. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav Brain Sci* **3**: 291–301.

Borta A, Wöhr M, Schwarting RKW. 2006. Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* **166**: 271–280.

Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers JL, Londen E, Rousselot J, Szyba K, Thévenet M, Sullivan-Wilson TA, Doyère V, Sullivan RM, et al. 2014. Infant rats can learn time intervals before the maturation of the striatum: evidence from odor fear conditioning. *Front Behav Neurosci* **8**: 176.

Brudzynski SM. 2013. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr Opin Neurobiol* **23**: 310–317.

Brudzynski SM. 2001. Pharmacological and behavioral characteristics of 22kHz alarm calls in rats. *Neurosci Biobehav Rev* **25**: 611–617.

Brudzynski SM. 2005. Principles of rat communication: quantitative parameters of ultrasonic calls in rats. *Behav Genet* **35**: 85–92.

Brudzynski SM, Chiu E. 1995. Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiol Behav* **57**: 1039–1044.

Brudzynski SM, Kehoe P, Callahan M. 1999. Sonographic structure of isolation-induced ultrasonic calls of rat pups. *Dev Psychobiol* **34**: 195–204.

Brudzynski SM, Ociepa D. 1992. Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. *Physiol Behav* **52**: 655–660.

Davis M, Walker DL, Miles L, Grillon C. 2010. Phasic vs Sustained Fear in Rats and Humans: Role of the Extended Amygdala in Fear vs Anxiety. *Neuropsychopharmacology* **35**: 105–135.

Ehret G. 2005. Infant Rodent Ultrasounds – A Gate to the Understanding of Sound Communication. *Behav Genet* **35**: 19–29.

Elsner J, Suter D, Alder S. 1990. Microanalysis of ultrasound vocalizations of young rats: Assessment of the behavioral teratogenicity of methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* **12**: 7–14.

Fanselow MS. 1986. Associative vs topographical accounts of the immediate shock-freezing deficit in rats: Implications for the response selection rules governing species-specific defensive reactions. *Learn Motiv* **17**: 16–39.

Frysztak RJ, Neafsey EJ. 1991. The Effect of Medial Frontal Cortex Lesions on Respiration, “Freezing,” and Ultrasonic Vocalizations during Conditioned Emotional Responses in Rats. *Cereb Cortex* **1**: 418–425.

Garcia S, Fourcaud-Trocmé N. 2009. OpenElectrophy: An Electrophysiological Data- and Analysis-Sharing Framework. *Front Neuroinformatics* **3**. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2694696/ (Accessed August 7, 2015).

Gardner CR. 1985. Distress vocalization in rat pups a simple screening method for anxiolytic drugs. *J Pharmacol Methods* **14**: 181–187.

Gilles EE, Schultz L, Baram TZ. 1996. Abnormal corticosterone regulation in an immature rat model of continuous chronic stress. *Pediatr Neurol* **15**: 114–119.

Haney M, Miczek KA. 1994. Ultrasounds emitted by female rats during agonistic interactions: effects of morphine and naltrexone. *Psychopharmacology (Berl)* **114**: 441–448.

Harvey AT, Hennessy MB. 1995. Corticotropin-releasing factor modulation of the ultrasonic vocalization rate of isolated rat pups. *Dev Brain Res* **87**: 125–134.

Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Mouly A-M. 2011. The RUB cage: respiration–ultrasonic vocalizations–behavior acquisition setup for assessing emotional memory in rats. *Front Behav Neurosci* **5**: 25.

Hennessy MB, Weinberg J. 1990. Adrenocortical activity during conditions of brief social separation in preweaning rats. *Behav Neural Biol* **54**: 42–55.

Hodgson RA, Guthrie DH, Varty GB. 2008. Duration of ultrasonic vocalizations in the isolated rat pup as a behavioral measure: Sensitivity to anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacol Biochem Behav* **88**: 341–348.

Hofer MA. 1996. Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* **21**: 203–217.

Hofer MA, Reiser MF. 1969. The development of cardiac rate regulation in preweanling rats. *Psychosom Med* **31**: 372–388.

Hofer MA, Shair H. 1978. Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-week-old rats. *Dev Psychobiol* **11**: 495–504.

Hofer MA, Shair HN, Brunelli SA. 2001. Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. In *Current Protocols in Neuroscience*, John Wiley & Sons, Inc. http://onlinelibrary.wiley.com.docelec.univ-lyon1.fr/doi/10.1002/0471142301.ns0814s17/abstract.

Ise S, Ohta H. 2009. Power spectrum analysis of ultrasonic vocalization elicited by maternal separation in rat pups. *Brain Res* **1283**: 58–64.

Jelen P, Soltysik S, Zagrodzka J. 2003. 22-kHz Ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behav Brain Res* **141**: 63–72.

Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. 1998. Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J Comp Psychol* **112**: 65–73.

Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. 2002. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol Bull* **128**: 961–977.

Litvin Y, Blanchard DC, Blanchard RJ. 2007. Rat 22 kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behav Brain Res* **182**: 166–172.

Noirot E. 1972. Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Dev Psychobiol* **5**: 371–387.

Noirot E. 1968. Ultrasounds in young rodents. II. Changes with age in albino rats. *Anim Behav* **16**: 129–134.

Oswalt GL, Meier GW. 1975. Olfactory, thermal, and tactual influences on infantile ultrasonic vocalization in rats. *Dev Psychobiol* **8**: 129–135.

Panksepp J, Burgdorf J. 2000. 50-kHz chirping (laughter?) in response to conditioned and unconditioned tickle-induced reward in rats: effects of social housing and genetic variables. *Behav Brain Res* **115**: 25–38.

Raineki C, Holman PJ, Debiec J, Bugg M, Beasley A, Sullivan RM. 2010. Functional emergence of the hippocampus in context fear learning in infant rats. *Hippocampus* **20**: 1037–1046.

Riede T. 2013. Stereotypic Laryngeal and Respiratory Motor Patterns Generate Different Call Types in Rat Ultrasound Vocalization. *J Exp Zool Part Ecol Genet Physiol* **319**: 213–224.

Roberts LH. 1972. Correlation of respiration and ultrasound production in rodents and bats. *J Zool* **168**: 439–449.

Roberts LH. 1975. Evidence for the laryngeal source of ultrasonic and audible cries of rodents. *J Zool* **175**: 243–257.

Rohitsingh S-A, Smith JA, Shair HN. 2011. Sex and experience influence behavioral responses of adult rats to potentiated and nonpotentiated ultrasonic vocalizations of pups. *Dev Psychobiol* **53**: 677–684.

Roth TL, Sullivan RM. 2005. Memory of early maltreatment: Neonatal behavioral and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. *Biol Psychiatry* **57**: 823–831.

Roux SG, Garcia S, Bertrand B, Cenier T, Vigouroux M, Buonviso N, Litaudon P. 2006. Respiratory cycle as time basis: An improved method for averaging olfactory neural events. *J Neurosci Methods* **152**: 173–178.

Sales GD. 1972. Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Anim Behav* **20**: 88–100.

Sales (née Sewell) GD. 1972. Ultrasound and mating behaviour in rodents with some observations on other behavioural situations. *J Zool* **168**: 149–164.

Sanders I, Weisz DJ, Yang BY, Fung K, Amirali A. 2001. The mechanism of ultrasonic vocalisation in the rat. http://www.sfn.org/Annual-Meeting/Past-and-Future-Annual-Meetings/Abstract-Archive/Abstract-Archive-Detail?AbsYear=2001&AbsID=1389 (Accessed August 15, 2015).

Schouten WGP. 1988. Development of ultrasonic vocalization in the rat (Rattus norvegicus). *Proc Int Congr Appl Ethol Farm Anim* 384–391.

Sewell GD. 1970. Ultrasonic signals from rodents. *Ultrasonics* **8**: 26–30.

Shair HN, Smith JA, Welch MG. 2012. Cutting the vagus nerve below the diaphragm prevents maternal potentiation of infant rat vocalization. *Dev Psychobiol* **54**: 70–76.

Shionoya K, Hegoburu C, Brown BL, Sullivan RM, Doyère V, Mouly A-M. 2013. It's time to fear! Interval timing in odor fear conditioning in rats. *Front Behav Neurosci* **7**: 128.

Sirotin YB, Costa ME, Laplagne DA. 2014. Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior. *Front Behav Neurosci* **8**. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4235378/ (Accessed August 7, 2015).

Smotherman WP, Bell RW, Starzec J, Elias J, Zachman TA. 1974. Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice. *Behav Biol* **12**: 55–66.

Takahashi LK. 1992. Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male conspecifics in preweanling rats. *Physiol Behav* **52**: 493–498.

Takahashi LK, Turner JG, Kalin NH. 1991. Development of stress-induced responses in preweanling rats. *Dev Psychobiol* **24**: 341–360.

Takahashi N, Kashino M, Hironaka N. 2010. Structure of Rat Ultrasonic Vocalizations and Its Relevance to Behavior. *PLoS ONE* **5**: e14115.

Tonoue T, Ashida Y, Makino H, Hata H. 1986. Inhibition of shock-elicited ultrasonic vocalization by opioid peptides in the rat: a psychotropic effect. *Psychoneuroendocrinology* **11**: 177–184.

Vivian JA, Miczek KA. 1993. Diazepam and gepirone selectively attenuate either 20-32 or 32-64 kHz ultrasonic vocalizations during aggressive encounters. *Psychopharmacology (Berl)* **112**: 66–73.

Walker P, Carrive P. 2003. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience* **116**: 897–912.

Webber ES, Harmon KM, Beckwith TJ, Peña S, Burgdorf J, Panksepp J, Cromwell HC. 2012. Selective breeding for 50 kHz ultrasonic vocalization emission produces alterations in the ontogeny and regulation of rough-and-tumble play. *Behav Brain Res* **229**: 138–144.

Weber M, Paxinos G, Richardson R. 2000. Conditioned changes in ultrasonic vocalizations to an aversive olfactory stimulus are lateralized in 6-day-old rats. *Dev Psychobiol* **37**: 121–128.

White NR, Cagiano R, Moises AU, Barfield RJ. 1990. Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (Rattus norvegicus). *J Comp Psychol Wash DC 1983* **104**: 255–262.

Willadsen M, Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M. 2014. Rodent ultrasonic communication: Male prosocial 50-kHz ultrasonic vocalizations elicit social approach behavior in female rats (Rattus norvegicus). *J Comp Psychol Wash DC 1983* **128**: 56–64.

Wöhr M, Borta A, Schwarting RKW. 2005. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: A dose–response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem* **84**: 228–240.

Wöhr M, Schwarting RKW. 2013. Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. *Cell Tissue Res* **354**: 81–97.

Wöhr M, Schwarting RKW. 2008. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behav Neurosci* **122**: 310–330.

Wöhr M, Schwarting RKW. 2007. Ultrasonic Communication in Rats: Can Playback of 50-kHz Calls Induce Approach Behavior? *PLoS ONE* **2**: e1365.

Zeskind PS, McMurray MS, Garber KA, Neuspiel JM, Cox ET, Grewen KM, Mayes LC, Johns JM. 2011. Development of translational methods in spectral analysis of human infant crying and rat pup ultrasonic vocalizations for early neurobehavioral assessment. *Child Adolesc Psychiatry* **2**: 56.

Discussion et perspectives

Cette discussion a pour objectif de revenir sur quelques points de réflexion qui n'ont pas pu être abordés dans les deux études de la thèse. Ces réflexions seront également accompagnées de quelques données préliminaires et analyses complémentaires qui les étayent. Je discuterai en particulier des paramètres utilisés pour mesurer la mémoire temporelle, de la neurobiologie de la mémoire temporelle chez le rat adulte et le raton et des modifications que l'on peut observer dans l'expression de la réponse émotionnelle au cours de la vie du rat.

I. La respiration, le freezing et les USV comme indices de mesure de la mémoire temporelle

1. Les USV, un indice peu adapté pour mesurer la mémoire temporelle

L'étude de la réponse temporelle des rats à une odeur conditionnée que j'ai présentée dans ce manuscrit a utilisé la respiration et le freezing comme mesures de la réponse émotionnelle. L'étude de Shionoya et al (2013) utilisait ces paramètres et y ajoutait les USV. Il a ainsi pu être démontré que si ces trois paramètres sont de bonnes mesures de l'état émotionnel de l'animal tout au long de la vie, ils ne permettent pas tous d'étudier sa mémoire temporelle. En effet, Shionoya et al (2013) avaient montré que les USV diminuent drastiquement en réponse immédiate à l'arrivée de l'odeur et ré-augmentent avant le choc. Toutefois, cette ré-augmentation n'était quasiment pas modifiée par un changement de la durée à encoder puisque la courbe de réponse vocale en réponse à une odeur signalant un intervalle de 20 s se superpose très bien avec celle en réponse à un intervalle de 30 s. Les USV ne sont donc pas un bon indice pour mesurer la mémoire temporelle et nous avons donc choisi de ne pas étudier les USV dans notre étude de la mémoire temporelle au cours de l'ontogenèse.

2. Le freezing, un indice de la mémoire temporelle sous certaines conditions

Le freezing semble être une mesure valable de la mémoire temporelle chez le rat adulte lorsque l'apprentissage de deux durées se fait de façon séquentielle sur les mêmes animaux, ainsi qu'étudié par Shionoya et al (2013), mais pas lorsqu'il se fait de façon séparée sur des groupes d'animaux différents, ainsi que réalisé dans notre étude.

Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que dans l'étude de Shionoya et al (2013), la mise en place d'une réponse temporelle à un premier intervalle a pu favoriser l'émergence de la réponse au second intervalle. En effet, quelle que soit la durée à apprendre, une réponse comportementale temporellement adaptée aux conditions expérimentales met un certain temps à se former (Ohyama et al. 2006; Boulanger Bertolus et al. 2015). Dans l'article de Shionoya et al (2013), l'apprentissage d'une deuxième durée permettrait donc de surentraîner les rats par rapport à l'apprentissage de la première durée et de faciliter l'expression d'une réponse comportementale temporellement adaptée. De plus, la comparaison intra-groupe du comportement temporel telle que réalisée par Shionoya et al (2013) permet de gagner en sensibilité : en effet, chaque individu a une réponse temporelle dont le décours est caractéristique de l'individu (comme une signature) et est modifié proportionnellement à la durée de l'intervalle lorsque celui-ci change (Brown et al. 1992). De plus, une comparaison intra-groupe augmente la puissance statistique du test, ce que participe aussi au gain de sensibilité.

3. La respiration : un bon indice de la mémoire temporelle

Contrairement aux USV et au freezing, nous avons montré que la respiration est un bon moyen de mesurer la perception temporelle du rat à tous les âges étudiés et quel que soit le paradigme utilisé (un seul groupe de rat apprenant 2 durées ou 2 groupes de rats apprenant chacun une durée différente). La raison de cette grande sensibilité de la mesure respiratoire pourrait résider dans le lien fort qu'elle entretient avec les émotions (Homma and Masaoka 2008; Stevenson and Ripley 1952; Boiten et al. 1994; Boiten 1998; Ley 1999; Hegoburu et al. 2011) mais également dans le fait que le signal respiratoire est modulé très rapidement (d'un cycle à l'autre dans le cas d'une perception olfactive par exemple Kepecs et al. 2007) et qu'il admet des variations plus subtiles qu'une mesure comme le freezing par exemple qui est plutôt une réponse de type tout ou rien. La modulation du rythme cardiaque et de la pression sanguine remplit également ces conditions et il est donc possible que ces paramètres soient de bons indices de la mémoire temporelle.

4. Influence de la durée de l'intervalle à apprendre sur le décours temporel de la réponse

Dans le cas où le rat n'apprend qu'une durée, on observe des décours temporels de la réponse respiratoire en réponse à un intervalle de 30 s plus aplatis et moins clairs que lorsque l'intervalle appris est de 20 s. Cette observation est en accord avec les données de la littérature qui montrent que plus un intervalle à apprendre est long, plus la réponse comportementale est atténuée et le temps d'acquisition de la réponse conditionnée est long. En effet, ainsi qu'on peut le voir Figure 41A, dans une procédure de FI dans laquelle une récompense alimentaire est donnée tous les x secondes, plus l'intervalle entre les récompenses est long, plus le nombre moyen d'entrées dans le magasin par 5 s est faible. De la même manière, nous avons pu observer en particulier chez les ratons que le motif temporel de la réponse à l'odeur est plus aplati lorsque l'intervalle est plus long. On peut supposer que chez nos rats adultes, le décours temporel de la réponse respiratoire à l'odeur est également diminué en amplitude, masquant par exemple la diminution de la fréquence respiratoire anticipatrice du choc dans notre groupe apprenant un intervalle de 30 s. De plus, à intervalle inter-essai fixe, plus la durée de l'intervalle à encoder est grande, plus le temps d'acquisition d'une réponse temporelle conditionnée est grand (voir Figure 41B), ce qui peut laisser supposer que notre groupe apprenant une durée de 30 s pourrait nécessiter plus de temps pour développer une réponse anticipatrice bien définie comme celle qu'on peut observer chez l'adulte pour la respiration en réponse à un intervalle de 20 s par exemple.

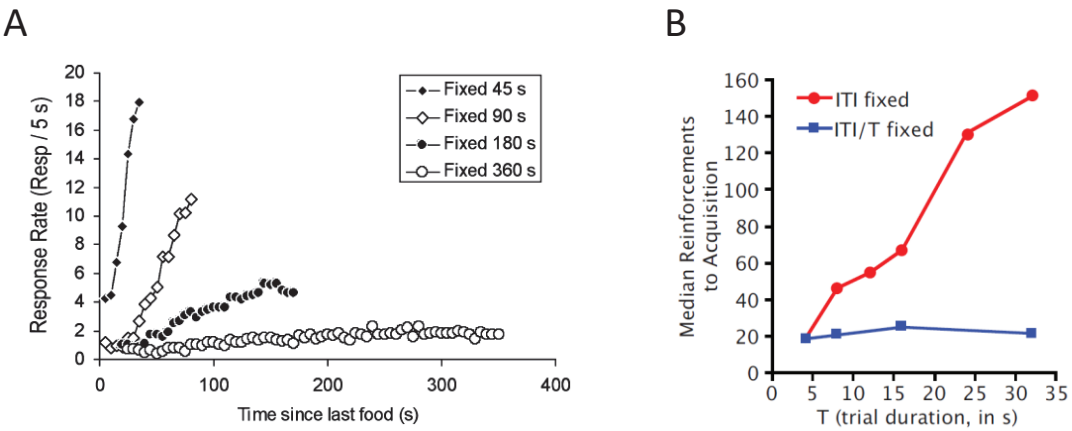


Figure 41 : A. Taux de réponse dans une tâche de FI avec différents intervalles inter-renforcement. On constate que plus l'intervalle est long, plus le taux de réponse moyen est faible (extrait de Balsam et al. 2009). B. Nombre d'essais nécessaires à l'établissement d'une réponse conditionnée chez des pigeons associant un SC à de la nourriture en fonction de la durée de l'intervalle SC-SI (T) selon si l'intervalle inter-essai (ITI) est fixé à 48 s

(groupe ITI fixe) ou s'il varie proportionnellement à la durée à encoder (groupe ITI/T fixed) (extrait de Balsam et al. 2010).

5. La respiration, une mesure de la mémoire temporelle quelle que soit la modalité sensorielle?

Nous avons vu dans l'introduction que respiration et olfaction sont étroitement liées, puisque l'échantillonnage du stimulus olfactif se fait via une augmentation du rythme respiratoire (flairage). Il se pourrait donc que la capacité de la respiration à refléter la mémoire temporelle soit vraie dans le cas d'un stimulus olfactif, mais pas dans le cas d'un stimulus conditionné d'une autre modalité sensorielle. Quel serait alors le décours temporel de la respiration en réponse à un stimulus conditionné non olfactif ? J'ai réalisé des expériences préliminaires pour répondre à cette question avec des lycéennes reçues au laboratoire dans le cadre d'une découverte de la recherche avec l'association Science Académie. Cette question est ensuite devenue le sujet de stage de Master 1 et 2 de Maryne Dupin. Les résultats préliminaires nous permettent de confirmer que la réponse respiratoire au stimulus conditionné est constituée de 2 parties (voir Figure 42), une première partie stimulus-spécifique qui présente un décours temporel distinct selon si le SC est olfactif ou auditif, et une seconde partie qui exprime une anticipation du choc et dont le décours temporel est identique quelle que soit la modalité sensorielle utilisée.

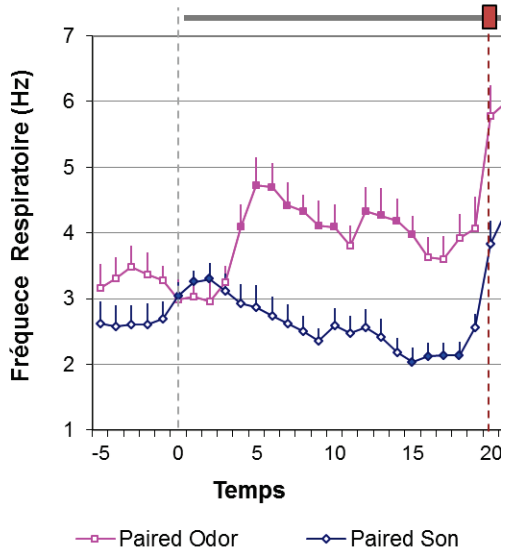


Figure 42 : Réponse respiratoire de rats adultes à une odeur ou un son au cours des derniers essais d'un conditionnement de peur à l'odeur ou au son. On observe que le décours temporel de la phase initiale (les 10 premières secondes du stimulus) de la réponse respiratoire est lié à la nature du stimulus alors que la réponse respiratoire anticipatrice du choc (les 10 secondes qui précèdent le choc) consiste en une diminution de la fréquence respiratoire quelle que soit la modalité sensorielle utilisée. Données de Maryne Dupin.

Il est ici intéressant de noter que le rat présente toujours une augmentation de sa fréquence respiratoire en début de présentation du SC. Au début du conditionnement, cette réponse est vraisemblablement une réponse d'orientation et son amplitude et sa latence dépendent de la modalité sensorielle étudiée : l'augmentation de fréquence respiratoire est importante (près de 2 Hz) et tardive dans le cas d'un SC olfactif et plus faible (moins de 1 Hz) et plus précoce lorsque le SC est un son. Ces différences peuvent être expliquées par la latence d'arrivée et de perception des stimuli auditifs et olfactifs. A la fin du conditionnement (le cas des courbes présentées Figure 42), une telle augmentation de la fréquence respiratoire pourrait également refléter une réponse émotionnelle du rat. En effet, nous avons vu que la respiration du rat est modulée par son état émotionnel (Clarke and Trowill 1971;

Frysztak and Neafsey 1991; Nsegbe et al. 1999; Homma and Masaoka 2008; Hegoburu et al. 2011; Shionoya et al. 2013).

Quelle que soit la nature du stimulus concerné, le rythme respiratoire présente donc une augmentation liée à la réponse d'orientation au stimulus. Cette augmentation pourrait également jouer un rôle dans la mémoire temporelle en signalant au cerveau l'arrivée d'un stimulus saillant qu'il est important de prendre en considération. De plus, nous avons vu que le rythme respiratoire peut contrôler les oscillations dans le système olfactif (Buonviso et al. 2006; Courtiol 2012). Cette propriété d'entraînement du rythme oscillatoire neurophysiologique par la respiration est également observée dans d'autres structures comme l'hippocampe (Yanovsky et al. 2014). On peut faire l'hypothèse que cette modulation respiratoire des oscillations cérébrales est plus généralisée encore et pourrait participer à la synchronisation des oscillateurs du cortex dans un modèle de type SBF.

II. Neurobiologie de la mémoire temporelle dans la tâche de conditionnement de peur à l'odeur chez l'adulte

La première étude de cette thèse a démontré pour la première fois la possibilité des ratons de mémoriser et d'exploiter des informations temporelles dans le conditionnement auquel ils sont soumis : ils apprennent la durée de l'intervalle odeur-choc et expriment une réponse de peur temporellement adaptée à cette durée. Ce processus cognitif est réalisé chez le raton sans que le striatum soit activé de manière mesurable par la technique de cartographie métabolique par autoradiographie au 2-DG. Cette étude est pionnière dans l'exploration des capacités mnésiques temporelles du raton avant le sevrage mais elle questionne également le rôle du striatum dorsal chez l'adulte dans un conditionnement de peur à l'odeur, puisqu'elle montre qu'il est possible de mémoriser un intervalle de temps sans que cette structure soit impliquée.

1. Quel rôle pour le striatum dans le conditionnement de peur à l'odeur ?

a. Un rôle dans l'apprentissage de l'association ou dans celle de la composante temporelle ?

En effet, nous avons montré que le striatum était activé par le conditionnement de peur à l'odeur chez le rat adulte. Toutefois, cette activation ne permet pas de conclure quant au rôle de cette structure dans le conditionnement. Le striatum est-il impliqué dans la mémorisation de l'association odeur-choc ? Dans celle de l'intervalle odeur-choc ? Dans l'expression d'un comportement moteur temporellement adapté ?

Les études réalisées jusqu'à présent ne permettent pas de répondre de manière claire à cette question. En effet, comme nous l'avions discuté dans l'introduction à la mémoire temporelle, le striatum dorsal est impliqué dans le conditionnement de peur au son puisque sa lésion empêche le conditionnement (Ferreira et al. 2003, 2008; Kishioka et al. 2009). Il est également impliqué dans la tâche d'évitement actif dans laquelle la cage expérimentale est divisée en 2 zones et le rat doit changer de zone lorsqu'un SC est présenté pour éviter un choc (Darvas et al. 2011; Wendler et al. 2014). Dans ces deux tâches, une composante temporelle peut être apprise (l'intervalle entre le SC et le SI). Au contraire, dans un conditionnement de peur au contexte, dans lequel le choc est associé à l'ensemble du contexte plutôt qu'à un stimulus discret, rendant la dimension temporelle moins informative, une lésion du striatum dorsal n'empêche pas le conditionnement (Ferreira et al. 2003, voir aussi groupe UP de notre étude). Ces données suggèrent que, si le striatum dorsal est impliqué dans le

conditionnement de peur, il ne serait recruté que lorsqu'une composante temporelle nécessite d'être encodée.

b. Quelques données préliminaires

Dans le cadre d'un conditionnement de peur à l'odeur, le rôle du striatum (la raison qui justifie son activation dans l'expérience d'autoradiographie) reste à élucider. Pour comprendre plus précisément l'implication du striatum dans le conditionnement de peur à l'odeur et le traitement de l'information temporelle qui y est contenue, nous avons acquis quelques données préliminaires d'inactivation du striatum au cours du conditionnement de peur à l'odeur de rats adultes. L'expérience consiste à observer dans quelle mesure le décours temporel de la réponse comportementale est affecté par l'inactivation du striatum : le rat est-il toujours capable d'exprimer une réponse temporellement adaptée à l'intervalle odeur-choc ? Peut-il exprimer des décours temporels de réponse différents à des intervalles de temps différents ?

Pour répondre à ces questions, nous avons implanté 28 rats Long Evans avec des canules dans le striatum au cours d'une chirurgie stéréotaxique sous anesthésie. Après une semaine minimum de récupération, les rats sont divisés en 2 groupes. Un groupe (LIDO, *n* = 13) reçoit une injection de lidocaïne[15] 4% juste avant un conditionnement de peur à l'odeur alors que le groupe contrôle (*n* = 14) reçoit une injection de liquide céphalorachidien artificiel (LCR). Au cours de ce conditionnement, l'intervalle odeur-choc était de 20 s et la capacité des rats à mémoriser cet intervalle de temps est estimée en mesurant leur fréquence respiratoire et leur freezing. Cette analyse permet d'observer que chez les rats LIDO, on observe un décours temporel de la respiration et du freezing similaire à celui décrit par Shionoya et al (2013), dès les premiers essais du conditionnement, soit bien avant que les rats contrôles n'expriment ce décours temporel (Figure 43).

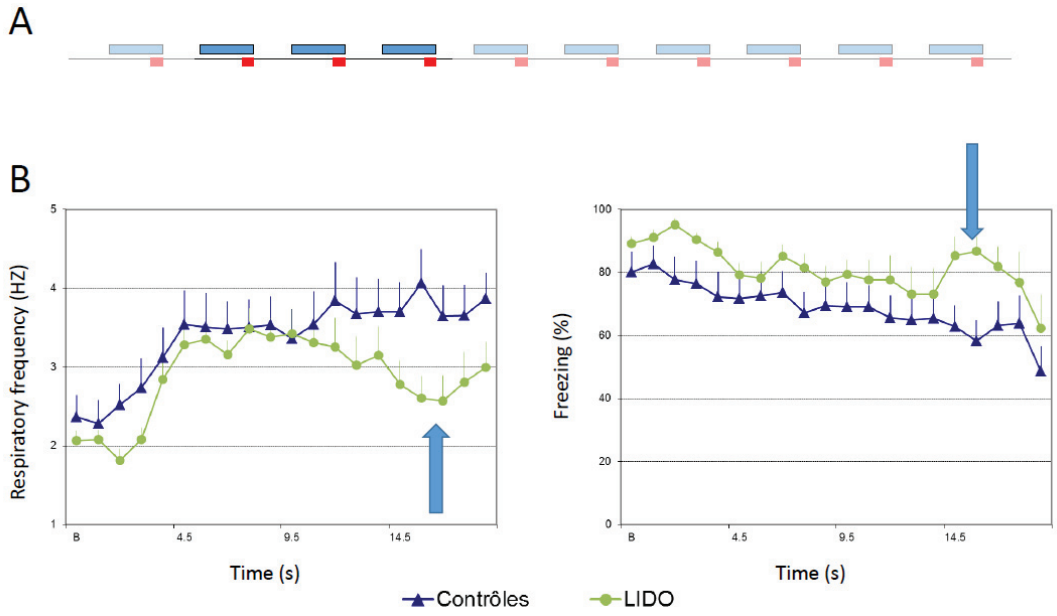


Figure 43 : A. Le comportement du rat est observé en début de conditionnement, pendant les 3 premiers essais pendant lesquels la durée de l'intervalle odeur-choc peut être connue. B. Fréquence respiratoire et Freezing observés pendant cette période chez les rats LIDO et les contrôles.

[15] La lidocaine est un anesthésique local qui agit en inhibant la conduction nerveuse via le blocage des canaux sodiques.

Il semblerait donc que, contrairement à ce qui était attendu, l'inactivation du striatum dorsal par une injection de lidocaïne juste avant le conditionnement facilite l'expression d'un comportement temporellement adapté.

Le jour suivant le conditionnement, les rats sont testés pour leur mémoire de l'association odeur-choc dans un contexte modifié. Ce test de rétention à 24h confirme que l'inactivation du striatum pendant l'acquisition n'a pas perturbé la force de l'association odeur-choc : les réponses de freezing et respiratoire au SC sont les mêmes que celles du groupe contrôle.

Quarante-huit heures après le conditionnement, les rats sont reconditionnés : ils reçoivent une première association avec un intervalle odeur choc de 20 s, puis 9 associations odeur-choc sont présentées avec un intervalle de 30 s. Comme pour le conditionnement, les rats sont injectés avec de la lidocaïne ou du LCR juste avant le reconditionnement.

Dans ce paradigme, les rats attendent le choc à un intervalle de 20 s après le début de l'odeur pour les deux premières odeurs présentées du reconditionnement (le rappel et la première présentation du nouvel intervalle). Pendant ces deux essais, les rats LIDO et contrôle expriment le même décours temporel de la respiration, montrant ainsi que l'inactivation du striatum dorsal n'empêche pas un rappel correct de l'intervalle. Toutefois, une fois que le nouvel intervalle leur a été présenté, les groupes LIDO et contrôles expriment des décours temporel de la fréquence respiratoire et du freezing très différents. Plus précisément, le groupe LIDO montre un changement de décours temporel adapté au nouvel intervalle dès les premiers essais alors que les rats contrôles mettent plus de temps à exprimer un nouveau décours temporel (Figure 44).

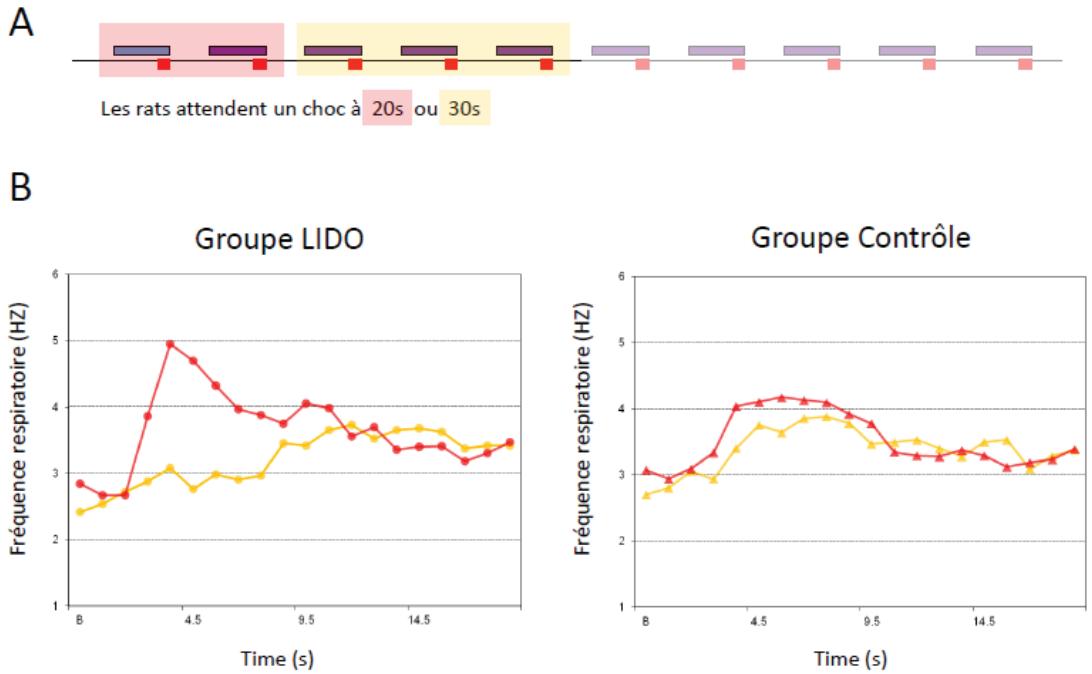


Figure 44 : A. Protocole de la séance de reconditionnement B. La courbe moyenne de respiration lors des deux premiers essais (en rouge) est comparée à la courbe moyenne des 3 essais suivants (en jaune) dans le groupe LIDO et dans le groupe Contrôle.

Ces données préliminaires suggèrent que l'inactivation du striatum en utilisant de la lidocaïne facilite le décalage de la courbe de respiration vers la nouvelle durée apprise. Les résultats obtenus pendant le premier conditionnement à 20 s et le reconditionnement à 30 s suggèrent alors que le

striatum serait impliqué dans le maintien en mémoire d'une réponse temporelle acquise, ce qui limiterait la plasticité temporelle du comportement et retarderait le changement vers un nouveau décours temporel.

c. Comment concilier ces données avec la littérature existante ?

De nombreuses données dans la littérature, que ce soit chez l'Homme ou chez l'animal, sont en accord avec l'idée que le striatum est impliqué dans l'encodage du temps (Apicella et al. 1992; Matell et al. 2003; Meck 2006; Mello et al. 2015; Gouvêa et al. 2015; pour revue, voir Coull et al. 2011). Toutefois, une large portion de ces données sont issues de techniques d'enregistrement électrophysiologique de l'activité du striatum montrant une activation croissante pendant l'intervalle à mesurer (Apicella et al. 1992; Matell et al. 2003). Si ces expériences permettent d'affirmer que l'activité du striatum dépend des paramètres temporels de la tâche, elles ne permettent cependant pas de déterminer le rôle du striatum dans l'encodage du temps.

Certaines études ont cherché à établir un lien de causalité entre striatum et encodage du temps en lésant ou modifiant l'activité du striatum. Chez le rat, la première de ce type est l'étude de Meck (2006b) : des rats sont entraînés dans une tâche de PI dans laquelle ils reçoivent un renforcement à intervalle fixe sous réserve qu'ils appuient sur un levier. Une fois la tâche correctement apprise, leur striatum dorsal est lésé par l'administration d'un courant électrique dans la structure (lésion complète du striatum) ou l'injection de 6-OHDA (6-hydroxydopamine, lésion spécifique des cellules réceptrices à la dopamine). Dans les deux cas, le contrôle temporel est aboli suite à ces lésions. Cette expérience permet de déterminer que le striatum et la dopamine sont nécessaires à l'expression d'un comportement moteur adapté aux conditions temporelles de l'expérience (i.e. temps d'arrivée du renforcement).

Plus récemment, toujours dans une expérience de PI, MacDonald et al (2012) ont injecté de l'anisomycine, un bloqueur de synthèse protéique, dans le striatum dorsal et ont mesuré l'influence de cette injection sur le décours temporel de l'appui levier lorsque les rats devaient apprendre une nouvelle durée plus longue. Ils ont ainsi montré que le blocage de la synthèse protéique dans le striatum dorsal n'empêche pas le déplacement de la courbe temporelle d'appui sur levier vers la nouvelle durée à encoder, mais empêche ou retarde l'expression d'un appui levier adapté de manière optimale à cette nouvelle durée : les rats commencent bien à appuyer sur le levier plus tard mais gardent un début d'appui levier plus précoce que des rats contrôles. Lorsque le comportement temporel est déjà établi, une telle injection n'empêche pas une production temporelle adaptée. Par conséquent, la synthèse protéique dans le striatum dorsal n'est pas nécessaire pour produire un comportement temporel adapté au paradigme expérimental ou pour détecter une modification dans les caractéristiques temporelles de la tâche, mais elle est impliquée dans l'adaptation optimale du comportement à la nouvelle durée.

Il est important de noter que ces deux études (Meck 2006b; MacDonald et al. 2012) utilisent une procédure de PI qui nécessite de nombreuses séances de conditionnement et peut conduire à un comportement automatisé (*habit learning*). Or le striatum est largement impliqué dans l'automatisation des taches motrices (Yin and Knowlton 2006). On peut faire l'hypothèse que le striatum est impliqué dans la production d'une réponse temporelle motrice plutôt que dans l'encodage et la mémorisation d'intervalles de temps. Dans cette hypothèse, la durée de l'intervalle à encoder est initialement perçue par un autre réseau neuronal qui informe le striatum des caractéristiques temporelles auxquelles l'organisme doit adapter son comportement.

Une procédure alternative pourrait permettre d'interroger le rôle du striatum dans une tâche moins sujette à une automatisation. La tâche de bissection temporelle serait adaptée à cette question : dans cette tâche le rat apprend à discriminer un intervalle court et un intervalle long en appuyant sur des leviers différents et doit ensuite caractériser un ensemble d'intervalles intermédiaires comme « court » ou « long ». Elle demande donc au sujet de faire attention à chaque durée présentée avant de faire un choix entre deux réponses possibles. Gouvêa et al (2015) ont injecté dans le striatum du muscimol, un agoniste GABAergique, et observent une diminution de la sensibilité temporelle de rats soumis à une tâche de bissection.

A l'inverse des études citées ci-dessus, nos expériences préliminaires montrent que, dans le conditionnement de peur à l'odeur qui ne comporte très peu d'essais de conditionnement, l'expression d'un comportement temporellement adapté est facilitée lorsque l'activité du striatum est inhibée par l'injection de lidocaïne. Nous pourrions faire l'hypothèse qu'un striatum fonctionnel permet le maintien d'une réponse conditionnée au détriment de sa flexibilité et que l'inactivation du striatum autorise un comportement plus flexible, et la modification rapide du décours temporel de la réponse conditionnée.

Nos données sont toutefois en contradiction avec celles de la littérature pré-existante et nécessiteraient des expériences supplémentaires pour mieux décrire l'effet observé, et dans quelle mesure il dépend de la technique d'inactivation utilisée (lidocaïne *vs* lésion *vs* muscimol) et/ou du paradigme expérimental (conditionnement pavlovien de peur *vs* PI *vs* bissection).

2. Si ce n'est le striatum, qui donc ?

Les données de la littérature que j'ai présentées ne permettent donc pas d'après moi d'établir un rôle causal direct du striatum dans l'établissement de la trace mnésique temporelle. De plus, mes données préliminaires d'injection de lidocaïne ou celle de Gouvêa et al (2015) d'injection de muscimol suggèrent qu'au contraire le striatum serait impliqué dans le maintien d'un comportement adapté à une durée. L'apprentissage de la composante temporelle du conditionnement de peur à l'odeur reposerait donc sur d'autres structures, ou réseau de structures.

Balsam et ses collègues (2010, 2002) ont suggéré, comme d'autres, que la composante temporelle d'une association est apprise en même temps que l'association elle-même. Nous pouvons pousser l'hypothèse plus loin et suggérer que la composante temporelle est apprise grâce aux mêmes réseaux que l'association, en tant que composante intégrante de cette association. Dans le conditionnement de peur à l'odeur, l'association entre l'odeur et le choc est permise par un réseau incluant le cortex piriforme postérieur et de l'amygdale. Or nous avions mentionné en introduction de la mémoire temporelle que des expériences ont montré que l'amygdale et les structures sensorielles pourraient être impliquées dans la mémoire temporelle. En particulier dans le cas d'un conditionnement de peur, Dìaz-Mataix et al (2013) ont montré que si lors de la réactivation d'une mémoire de peur on change la durée de l'intervalle SC-SI, alors on induit une phase de synthèse protéique nécessaire à la reconsolidation de cette mémoire. Cela montre de façon indirecte que l'amygdale est impliquée dans la détection des relations temporelles entre les événements. De plus, Shionoya et al (2013) ont montré que perturber l'activité dopaminergique de l'amygdale empêche l'expression d'un comportement temporel dans un conditionnement de peur à l'odeur. L'amygdale aurait donc la capacité à détecter des différences entre une durée apprise et une durée perçue et à contrôler l'expression d'un comportement temporellement adapté aux conditions expérimentales. Pour cela, il faut qu'elle ait accès à l'information temporelle. Cette information pourrait être apportée par les structures sensorielles elles-mêmes. En effet, des enregistrements électrophysiologiques ou

neurochimiques (par microdialyse intracérébrale) dans les structures sensorielles (Park et al. 2014; Li et al. 2014; Hegoburu et al. 2009) suggèrent l'existence de neurones ou de populations de neurones sensibles à la durée du stimulus sensoriel ou aux composantes temporelles du paradigme subit. Ceux-ci pourraient permettre d'amener l'information temporelle sensorielle vers l'amygdale.

La localisation de la trace mnésique elle-même reste très spéculative dans ce modèle et l'hypothèse que les relations temporelles SC-SI sont une part intégrante de l'association et sont encodées par les mêmes structures voire les mêmes mécanismes rend la recherche du support neural complexe : dans cette hypothèse, toute lésion du système encodant l'intervalle odeur-choc induit un déficit d'apprentissage de l'association odeur-choc.

III. Neurobiologie de la mémoire temporelle chez le raton

Nous avons montré que les ratons étaient capables d'exprimer un décours temporel différent en fonction de l'intervalle SC-SI appris. Cette capacité de perception du temps et d'adaptation du comportement à cette perception est réalisée à un âge où le striatum dorsal n'est pas impliqué dans le circuit. Cette étude était pionnière dans l'examen des capacités de mémoire temporelle chez des ratons avant sevrage. Ces capacités mnésiques des ratons avant le sevrage ont été confirmées par la suite au cours de la thèse de Lucille Tallot (2015) sous la direction de Valérie Doyère et Regina Sullivan, qui a non seulement confirmé que les ratons percevaient le temps mais a également montré que la mémoire qui était formée suite à cette perception peut être rappelée 24 h plus tard et comparée avec un nouvel intervalle de temps présenté.

Les capacités du raton à encoder des intervalles de temps sont donc clairement démontrées par l'expérience de notre première étude et par les résultats obtenus par Lucille Tallot (2015). Cette mémoire est persistante pour au moins 24h et permet au raton de comparer des intervalles de temps. La flexibilité du comportement du raton pour s'adapter à un nouvel intervalle de temps détecté reste toutefois à examiner, en relation avec les structures cérébrales fonctionnellement matures à cet âge. En effet, nous avons acquis des données préliminaires chez le rat adulte montrant que l'inactivation du striatum dorsal permet une adaptation plus rapide de la réponse comportementale à un nouvel intervalle. On peut donc suggérer que des ratons chez qui le striatum n'est pas fonctionnel, auront la capacité d'adapter très rapidement le décours temporel de leur réponse comportementale lors d'un changement de la durée à apprendre.

Toutefois, il est important de rappeler que le striatum n'est pas la seule structure fonctionnellement immature chez des ratons de PN12-15. En effet, le cortex préfrontal par exemple n'est pas encore fonctionnel pour de nombreuses tâches, notamment des tâches d'extinction (Kim and Richardson 2010) or une flexibilité de la réponse temporelle comportementale à l'odeur demanderait une inhibition des réponses de défense à l'odeur prédisant un intervalle de 20 s pour exprimer une réponse adaptée à un intervalle plus long. L'immaturité du cortex préfrontal chez le raton pourrait donc empêcher la flexibilité du comportement dans une situation temporelle nouvelle. Il est donc également possible que les ratons ne soient pas capables d'exprimer une réponse différente à l'odeur lorsqu'elle signale un intervalle de 20 ou 30 s, bien qu'ils soient capables de détecter la différence existante entre les deux intervalles (Tallot 2015).

Concernant les réseaux neuronaux qui permettent la perception, la mémorisation et la comparaison d'intervalles, nous avons fait l'hypothèse que, chez l'adulte, le temps serait encodé comme une composante intégrante des caractéristiques de l'association SC-SI et que les mécanismes neuronaux qui régissent cet encodage sont donc ceux permettant l'encodage de l'association odeur-

choc elle-même. Dans cette hypothèse, le temps serait encodé de la même manière chez le raton que chez le rat adulte : dans les deux cas la perception temporelle serait réalisée dans les structures sensorielles et transmises à l'amygdale. La comparaison des durées des intervalles aurait lieu en particulier dans l'amygdale (Dìaz-Mataix et al. 2013).

IV. L'expression de la réponse émotionnelle au cours de la vie du rat

1. Une modification forte de la réponse émotionnelle entre la prime enfance et l'âge adulte

a. La respiration

Le décours temporel de la réponse respiratoire à la présentation d'une odeur menaçante est modifié au cours de l'ontogenèse : d'une réponse qui augmente graduellement tout au long de la présentation d'une odeur conditionnée chez le raton, on observe une réponse en deux parties chez l'adulte (voir Figure 45A). D'après l'étude de Shionoya et al (2013), cette réponse respiratoire de l'adulte est constituée d'une première partie d'augmentation rapide du rythme respiratoire qui constituerait une réponse d'orientation vis à vis du stimulus olfactif. La deuxième partie de la réponse respiratoire adulte est plus représentative de l'anticipation du choc et présente une déflection juste avant l'arrivée de celui-ci qui est décalée vers le nouveau temps d'occurrence du choc si celui-ci est retardé.

Chez le raton, la réponse à l'odeur conditionnée est plus simple, constituée seulement d'une augmentation de la fréquence respiratoire. C'est la pente de cette courbe qui varie lorsque la durée de l'intervalle change et indique donc l'anticipation du choc. Les raisons de cette différence forte entre les réponses respiratoires infantile et adulte peuvent simplement résider dans une modulation respiratoire plus lente chez le raton (Welker 1964). En effet, lorsque qu'une odeur est présentée pour la première fois à un rat, il répond par une orientation comportementale et respiratoire. Une réponse de flairage se met en place, rapidement suivie d'un comportement de localisation de l'origine de l'odeur. Toutefois, une différence importante dans cette orientation respiratoire est observée entre des ratons et des rats adultes : les ratons augmentent leur fréquence respiratoire beaucoup plus lentement que les adultes, et n'atteignent pas les mêmes maxima (voir Figure 45B).

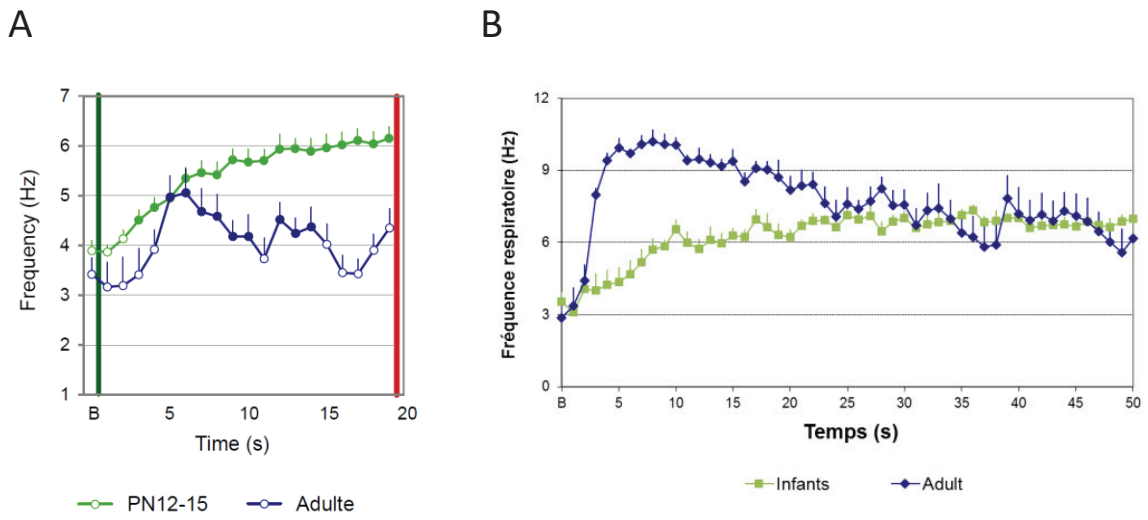


Figure 45 : Réponse respiratoire de ratons de PN12-15 et de rats adultes à l'odeur conditionnée (A) et à la première présentation d'une odeur inconnue (B)

On peut donc supposer que les capacités du raton à moduler leur fréquence respiratoire par des modifications rapides et de grande amplitude est encore immature (Alberts and May 1980), ce qui pourrait expliquer l'absence de modulation anticipatrice de la respiration sous forme de U juste avant le choc comme observé chez l'adulte. La fréquence respiratoire est également très liée à l'activité du rat, et les différences observées dans les décours temporels des réponses respiratoires à l'odeur pourraient également être expliquées par des modifications de la réponse comportementale au cours de l'ontogenèse.

b. Le freezing

En effet, les ratons et les rats adultes expriment également une réponse comportementale nettement différente à l'odeur (voir Figure 46). Les ratons s'activent en réponse à l'odeur apprise, exprimant ainsi une forte diminution du freezing. Au contraire, les rats adultes ne montrent pas ou peu de modulation du freezing en réponse à cette même odeur. Une observation similaire avait été faite par Hunt et al (1997) : suite à un conditionnement de peur à l'odeur, les rats adultes présente une réponse conditionnée majoritairement constituée de freezing alors que les ratons ont une réponse active de flairage et de mouvements de tête (voir Figure 47).

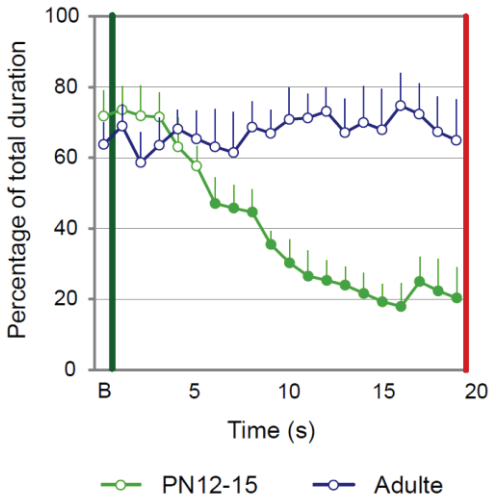


Figure 46 : Réponse de freezing de ratons de PN12-15 et de rats adultes à l'odeur conditionnée

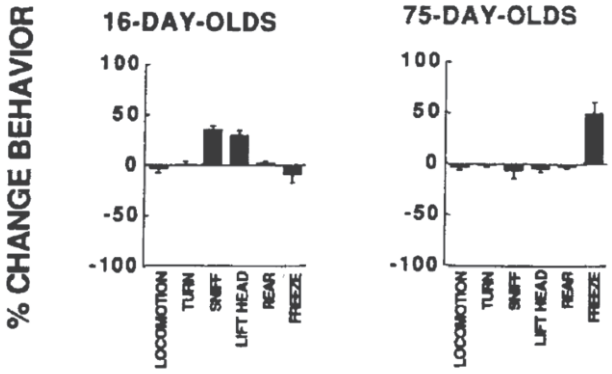


Figure 47 : Réponse de ratons de 16 jours et de rats adultes à un conditionnement de peur à l'odeur. Les modifications du comportement (dans l'ordre : locomotion, changement de direction, flairage, soulève la tête, se dresse, freeze) sont exprimées en pourcentage de changement pendant les 10 s de présentation de l'odeur par rapport aux 10 s précédent l'arrivée de l'odeur (adapté de Hunt et al. 1997).

Les raisons d'une telle différence et le passage d'une réponse proactive à une réponse passive à une même stimulation avec la maturation de l'animal sont spéculatives à ce stade : nous avons

mentionné en introduction l'existence d'un continuum des réponses de défense du rat entre le freezing et la fuite qui est entre autres contrôlé par la taille de la cage et la possibilité de s'échapper. Il est important de signaler ici que bien que la taille de la cage ait été adaptée en hauteur, elle ne l'a pas été en diamètre ce qui offre au raton un espace plus grand pour fuir proportionnellement à sa taille. De plus, le raton n'est pas encore capable d'encoder le contexte aux âges testés ici (Raineki et al. 2010a), et on peut supposer qu'il n'est donc pas capable de mémoriser l'absence d'échappatoire dans le dispositif expérimental. Ces deux points, diminution proportionnelle de la taille de la cage et apprentissage de l'absence d'échappatoire avec la maturation du rat, favorisent l'expression de freezing plutôt que de fuite chez le rat adulte par rapport au raton.

Une autre hypothèse pourrait expliquer les différences observées entre ratons et adultes en termes de freezing. En effet, nous avons vu que le freezing était partiellement contrôlé par le cortex prélimbique, une sous-structure du cortex préfrontal médian : léser le cortex prélimbique réduit la réponse de freezing et l'activité du cortex prélimbique est corrélée à la quantité de freezing exprimée (Milad and Quirk 2012). Or ce cortex est encore immature chez le raton (van Eden and Uylings 1985; Kim and Richardson 2010).

c. Les vocalisations ultrasoniques

Classiquement, les vocalisations sont décrites en réponse à des situations émotionnelles différentes chez le raton et le rat adulte : chez le raton, les études enregistrent le plus couramment la réponse émotionnelle de l'animal à une séparation de la mère et du nid, alors que les études chez le rat adulte travaillent plutôt sur une réponse à un stimulus aversif. Dans notre étude, nous avons souhaité comprendre plus précisément quels parallèles pouvaient être faits entre les USV ratons et adultes en soumettant des rats à trois âges de vie à un même stimulus aversif et enregistrant les émissions sur une large bande de fréquence. Nous avons donc montré que les USV émis en réponse à une même situation aversive sont constitués de deux bandes de fréquence autour de 40 et 70 kHz chez les ratons de 12-15 jours alors qu'un seul type d'USV à 22 kHz est émis par le rat adulte dans les mêmes conditions.

Les USV LF du raton et leur modulation par les conditions expérimentales

A l'intérieur des USV LF du raton, il est également possible qu'il faille encore distinguer deux sous-types, de la même manière que les USV à 22 kHz adultes se diviseraient en USV longs et courts. En effet, plusieurs laboratoires ont décrit une courbe bimodale de répartition des fréquences pour les USV du raton entre 30 et 50 kHz en réponse à un isolement (Insel et al. 1986; Ise and Ohta 2009). Selon Ise and Ohta (2009), les deux modes de cette courbe sont augmentés ou diminués l'un par rapport à l'autre lorsque la température d'isolement est modifiée : un pic d'USV est observé vers 36 kHz lorsque la température d'isolement est de 37°C alors que le pic de fréquence d'émission des USV est à environ 43 kHz lorsque l'isolement est réalisé à 15°C. Les deux pics sont visibles si la température d'isolement est intermédiaire (24°C). Il est intéressant de noter que Hofer et Shair (1992) ont également observé une modulation de la fréquence des USV émis par la température mais que cette modulation est l'inverse de celle montrée par Ise et Ohta (2009) : des ratons se réveillant d'une anesthésie hypothermique et dont la température corporelle est comprise entre 20 et 25°C émettent des USV plus longs, qui tendent à présenter une fréquence inférieure et un décours temporel différent des USV d'isolement que ces auteurs décrivent classiquement.

La température n'est pas le seul paramètre qui peut influencer la fréquence des vocalisations : Insel et al (1986) observent également une répartition bimodale des fréquences des USV LF et ont

montré que l'injection systémique de drogues anxiolytiques ou anxiogènes modifie cette répartition des fréquences. Ainsi, suite à l'injection de diazépam, un anxiolytique, la fréquence des USV LF des ratons devient unimodale, de fréquence moyenne inférieure aux modes observés avant injection. L'injection de pentylenetetrazol, un anxiogène, permet également l'obtention d'une courbe des fréquences des USV unimodale, mais sans modifier la fréquence moyenne.

Dans notre étude, les ratons sont isolés à une température comprise entre 25 et 30°C mais nous n'avons pas observé de courbe bimodale à l'intérieur des USV LF. Toutefois, l'arrivée du choc pourrait influencer la fréquence des vocalisations. Pour examiner ce point, j'ai comparé les fonctions de probabilité de distribution (PDF) des vocalisations émises pendant les 30 s précédant le choc et les 30 s qui le suivent. Ces PDF pré- et post-choc sont obtenus pour chaque animal, et l'existence d'une différence entre avant et après le choc est testée par des tests de permutation. Cette analyse permet de montrer une différence significative entre les distributions des fréquences avant et après le choc pour les USV LF (p = 0.05) mais la fréquence des USV HF n'est pas affectée par le choc (p = 0.32). On constate Figure 48 que le choc augmente la fréquence des USV LF lorsqu'il n'est pas signalé. De manière intéressante, cette différence entre les PDF des fréquences des USV avant et après le choc est annulée si le choc est signalé par une odeur.

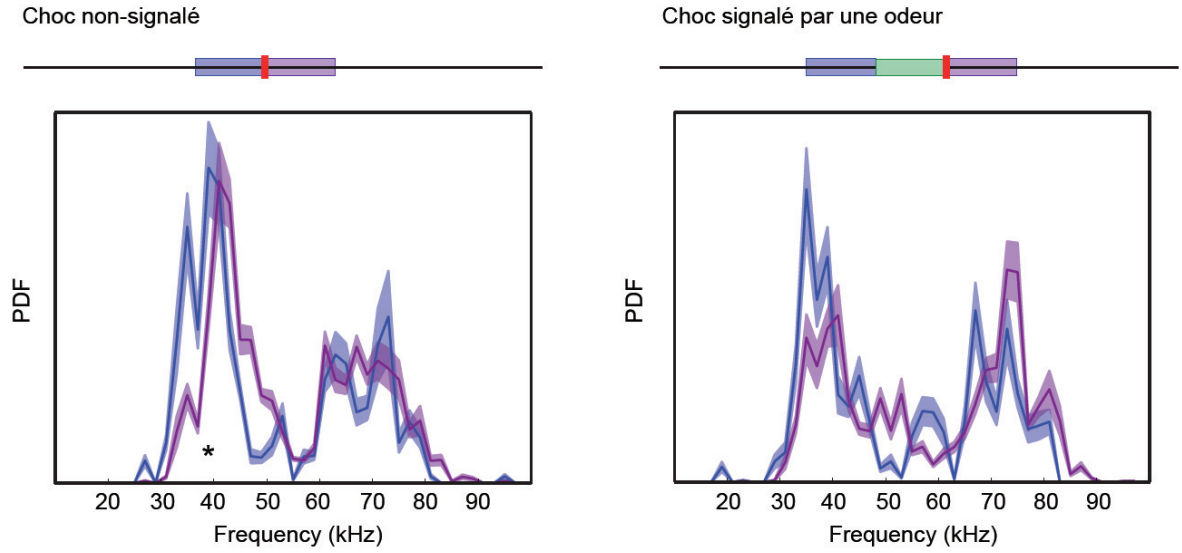


Figure 48 : Fonction de distribution des fréquences des vocalisations avant (bleu) et après (violet) le choc dans le cas d'un choc non signalé ou signalé par une odeur.

Les USV HF, de nouvelles vocalisations présentant un rôle spécifique ?

Notre étude a également permis de montrer l'existence d'un type de vocalisations infantiles qui n'avait pas été proprement décrit jusqu'à présent et dont le rôle et la signification exacts reste à comprendre. Ces vocalisations sont plus courtes et de fréquences plus élevées que les vocalisations classiquement décrites chez le raton. Elles sont émises en réponse à l'isolement de la mère mais leur taux d'émission n'est pas modulé lorsque le raton est mis en présence d'une mère active et potentiellement maltraitante. A ma connaissance, ces USV HF n'avaient pas encore été décrites en tant que sous-groupe d'USV. Toutefois, d'autres auteurs avaient déjà mentionné que les vocalisations pouvaient présenter les caractéristiques que nous décrivons chez le raton. Kim et Bao (2013), par exemple, présentent un diagramme de la durée des USV de ratons de PN15 en fonction de leur fréquence qui ressemble fortement au diagramme que nous avons présenté dans notre étude (voir Figure 49). Riede et al. (2015) mentionnent également l'existence d'USV « courtes », caractérisées par

une durée inférieure à 20 ms et une fréquence allant de 30 à 100 kHz, qui seraient compatibles avec les USV HF que nous décrivons.

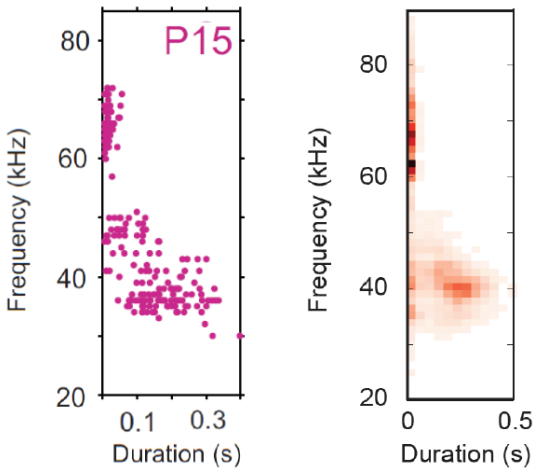


Figure 49 : Comparaison des USV enregistrées à PN15 par Kim et Bao (2013) (à gauche) et des USV que nous avons enregistré à PN12-15 (à droite) (adapté de Kim and Bao 2013).

De manière générale, nous avions signalé en introduction que de nombreux auteurs filtrent les hautes fréquences de leurs enregistrements avant de détecter les USV des ratons ou n'enregistrent qu'autour de 40 kHz, ce qui pourrait expliquer le fait qu'ils ne voient pas ces USV HF. D'autres auteurs ont enregistré les USV du raton jusqu'à 100 kHz ou plus (Brouette-Lahlou et al. 1992; Brunelli et al. 1997; Hashimoto et al. 2001, 2007; Kehoe et al. 2001; Wöhr and Schwarting 2008), mais d'autres paramètres comme les paramètres de détection automatique des USV pourraient expliquer un filtrage des USV HF. Par exemple, dans la détection automatique des USV que nous avons utilisé, il est nécessaire de définir un « hold time », soit une durée minimum de la vocalisation pour qu'elle soit considéré comme une vocalisation et non du bruit. Nous avons utilisé un hold time de 4 ms. Dans certaines études (par exemple, Wöhr and Schwarting 2008) le hold time utilisé est trop long (10 ms) pour permettre la détection d'une grande partie des USV HF.

Afin d'étudier plus en profondeur les différences entre vocalisations LF et HF, il serait intéressant d'étudier plusieurs points :

Sont-elles contrôlées par des circuits neuronaux identiques ? Chez l'adulte les USV à 22 et 50 kHz sont observées pour des états émotionnels différents et sont modulées par des circuits neuronaux distincts, les USV à 22 kHz principalement contrôlées par le système cholinergique alors que celles à 50 kHz sont principalement contrôlées par le système dopaminergique. Peut-on observer des différences similaires entre USV LF et HF chez le raton ? Nous avons mentionné un grand nombre de modulateurs pharmacologiques des USV LF chez le raton, avec notamment la stimulation des systèmes noradrénergique et glutamatergique qui augmentent le nombre d'USV et celle du système dopaminergique qui les inhibe. Ces modulations sont-elles identiques pour les vocalisations HF du raton ? L'étude de l'effet d'injections systémiques d'agents pharmacologiques sur les proportions relatives d'USV LF et HF pourrait apporter des réponses à ces questions.

Par ailleurs, nous avons signalé en introduction le rôle communicationnel des USV du raton puisque l'émission d'USV par un raton ou via des haut-parleurs induit chez la mère le comportement de recherche du raton et l'approche des haut-parleurs. Cette valeur de signal du raton vers la mère est-elle la même pour les vocalisations LF et HF ? Une expérience rejouant des USV LF et HF à la mère de manière séparée pourrait apporter plus d'information sur ce point.

Quel lien entre USV chez le raton et chez l'adulte ?

Nous avons décrit dans l'étude chapitre 8 l'existence de deux types d'USV chez le raton, caractérisées par des fréquences réparties en 2 bandes distinctes et modulées de manière différente par les conditions expérimentales. Cette description n'est pas sans rappeler les deux types USV décrits chez les rats plus âgés, dont les fréquences sont également bimodales, avec un mode à 22 kHz et un à 50 kHz. Toutefois, il est important de noter que les conditions d'émission ne sont pas identiques entre USV ratons et adultes pour une même bande de fréquence (voir Tableau 3). Deux hypothèses peuvent être faites suite à ces observations :

(1) Il existe un continuum entre les vocalisations émises par les ratons et celles émises par les rats adultes. Cette hypothèse rappelle la courbe proposée par Schouten (1988), moyennant quelques modifications (voir Figure 50).
(2) Les vocalisations HF du raton ne sont pas les précurseurs des USV à 50 kHz de l'adulte. Elles disparaissent avec la maturation du raton et les USV 50 kHz apparaissent avec l'apparition du jeu.

Tableau 3 : Contextes d'émission des USV basse (LF du raton et 22 kHz de l'adulte) et haute fréquence (HF du raton et 50 kHz de l'adulte) au cours de l'ontogenèse.

	Ratons	**Juvéniles**	**Adultes**
Basses fréquence	Situations douloureuses et anxiogènes	Situations douloureuses et agonistiques	Situations douloureuses et agonistiques
Haute fréquence	Situations douloureuses et anxiogènes	Jeu	Interactions sociales et sexuelles Interactions agonistiques

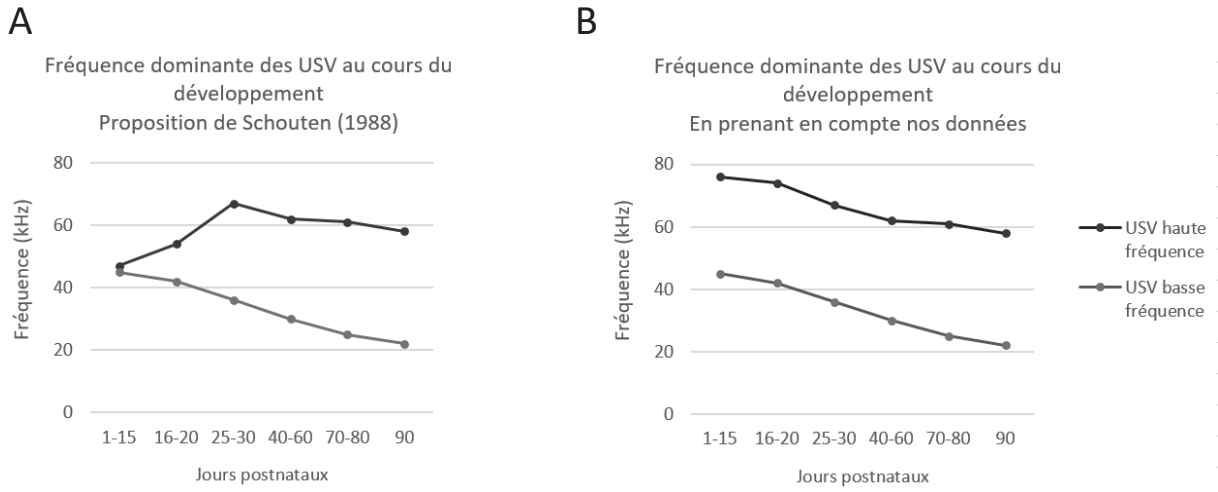


Figure 50 : A. Courbe proposée par Schouten (1988) représentant la fréquence des USV en fonction de l'âge du rat. B. Modification de la courbe de Schouten en incluant nos données suggérant un continuum entre les USV du raton et celles de l'adulte

Dans le cas des USV LF des ratons et celles à 22 kHz des adultes, nous avions déjà discuté en introduction qu'il semble probable que les USV à 22 kHz dérivent des USV LF du raton. En effet, il existe une corrélation entre la fréquence d'émission des USV et le poids de l'animal (Blumberg et al. 2000) et

elles sont affectées de manière équivalente par la majorité des drogues anxiolytiques et anxiogènes (Insel et al. 1986; Gardner 1985; Cuomo et al. 1988; Jelen et al. 2003; Branchi et al. 2001), ce qui suggère un lien entre USV à 40 kHz (nos USV LF) et USV à 22 kHz chez l'adulte. Il serait ainsi possible qu'ils constituent l'expression à différents âges d'un même état émotionnel, dont les caractéristiques et la modulation par des drogues ou des conditions externes peuvent être légèrement modifiées avec l'âge, possiblement en lien de la maturation du raton.

Toutefois, il existe des différences entre les USV LF des ratons et celles à 22 kHz des adultes qui suggèrent au contraire qu'elles sont bien distinctes. Nous pouvons citer ici pour rappel que certaines drogues ont des effets contraires sur les USV ratons et adultes (Farrell and Alberts 2000; Kehoe and Harris 1989), ou le fait qu'il n'y a pas de relation directe entre le taux d'USV émis chez un raton et celui émis par ce même individu en réponse à un conditionnement de peur à l'âge adulte (Schwarting and Wöhr 2012). A ces arguments, nous pouvons ajouter l'effet de l'arrivée du choc sur l'émission d'USV aux différents âges. En effet, si, comme nous l'avons montré dans l'article, les vocalisations du raton sont augmentées par l'arrivée du choc, celles des rats juvéniles et adultes ne sont pas modulées par le choc : un même nombre de vocalisations est émis pendant les 30 s avant et les 30 s après le choc à ces âges. En effet, on constate sur les exemples Figure 51 que le rat adulte ou juvénile commence ici à vocaliser en réponse au premier choc et vocalise ensuite en continu. Au contraire, les USV du raton sont modulées à chaque essai, augmentant après chaque choc et diminuant au fur et à mesure de l'essai.

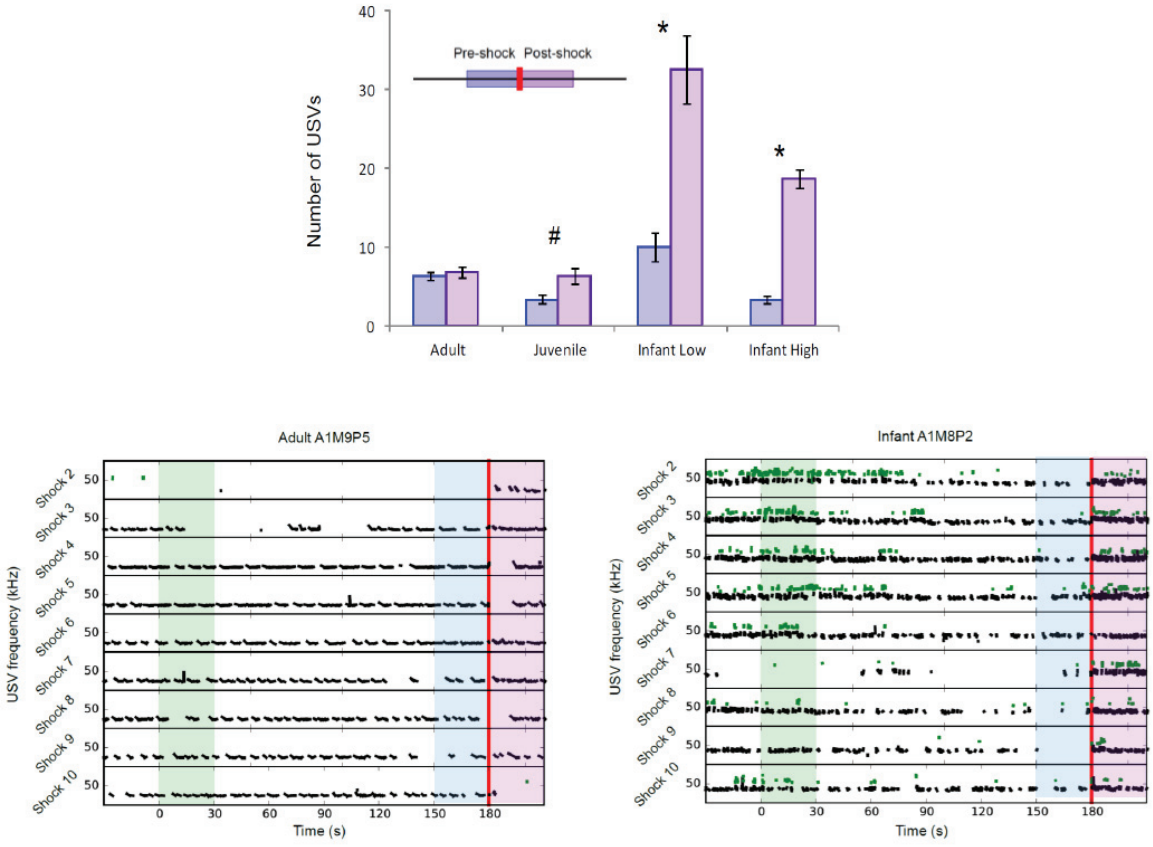


Figure 51 : Modulation de l'émission de vocalisations par l'arrivée du choc pour des rats pour lesquels le choc (en rouge) n'est pas prédit par l'odeur (présente pendant la zone verte). Le nombre de vocalisations pendant les 30 s avant (en bleu) et 30 s après (en violet) est moyenné entre les essais pour créer l'histogramme. Des exemples de rats adulte et de PN12-15 sont présentés en dessous. Pour le raton, les USV LF sont présentés en noir, les HF en vert.

Dans le cas des USV HF et des USV à 50 kHz des adultes, il n'est pas possible, à mon sens, de trancher entre ces deux hypothèses (continuité ou disparition-apparition) à ce jour. Alors que les caractéristiques fréquentielles tendent nettement à privilégier la première hypothèse, les différences de contexte d'émission entre USV raton et adultes abondent en faveur de la seconde. Il serait toutefois possible de faire pencher la balance en fonction de l'une ou l'autre hypothèse grâce à des expériences de modulation pharmacologiques de l'émission des USV tout au long de l'ontogenèse. En effet, si les USV d'une même bande de fréquence sont modulées de la même manière à différents âges, il est probable qu'il existe une continuité entre celles observées chez le raton et celles de l'adulte. Les expériences de pharmacologie des USV ayant été réalisées à ma connaissance soit chez l'adulte, soit chez le raton, il est difficile à ce jour de comparer les résultats de la littérature obtenus aux différents âges.

2. L'âge juvénile, un âge transition

Nous avons montré dans l'étude 2 sur les USV que le raton juvénile émet des vocalisations aux caractéristiques de fréquence et de durée intermédiaires entre des USV LF des ratons et des USV à 22 kHz adultes.

De manière générale, l'âge du sevrage semble être un âge « charnière » qui voit le passage d'une réponse émotionnelle de type « raton » à une réponse adulte. En effet, comme nous l'avons relevé, cette observation est vraie pour les vocalisations, avec la disparition des USV haute fréquence du raton en réponse un choc, l'apparition des USV à 50 kHz pendant le jeu et la modification des USV basse fréquence. Mais elle a également été faite pour la réponse cardiaque des rats à un conditionnement olfactif aversif. En effet, Hunt et al (1997) ont montré que lorsqu'un odeur est associée à un choc électrique, la présentation de l'odeur entraîne une tachycardie conditionnée chez le raton et une bradycardie conditionnée chez le rat adulte. La transition entre les deux âges se fait vers PN23 (voir Figure 52) : la réponse cardiaque moyenne de ratons de PN23 à l'odeur ne permet pas de déterminer de manière claire que les ratons expriment une réponse conditionnée à l'odeur. Toutefois, une analyse plus fine de ce groupe d'âge permet de montrer qu'il se divise en 2 sous-groupes : un premier sous-groupe de type « raton » qui répond à l'odeur par une tachycardie, et un sous-groupe de type « adulte » qui exprime une bradycardie conditionnée et du freezing à l'odeur.

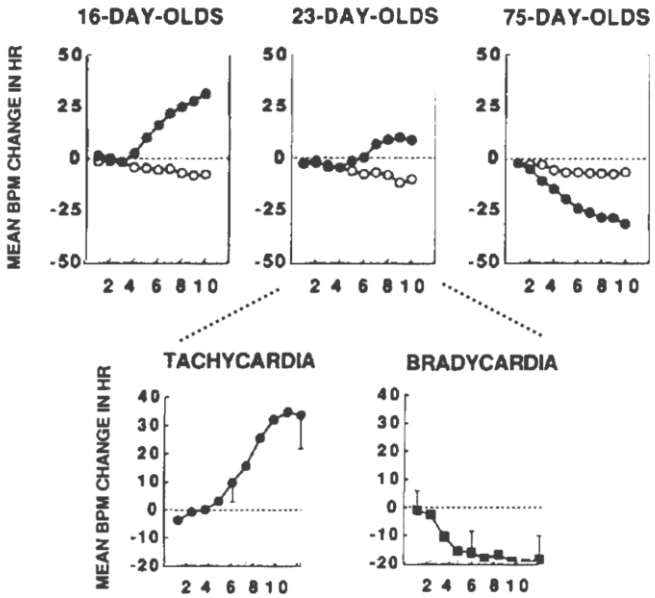


Figure 52 : Réponse cardiaque de rat de 16, 23 et 75 jours à une odeur conditionnée à la fin d'un conditionnement odeur-choc (moyenne des présentations 13 à 15). On observe une tachycardie chez les ratons de PN16, une bradycardie chez les adultes et une réponse plutôt indéterminée en moyenne chez les juvéniles. Ce groupe peut être divisé en 2 sous-groupes qui présentent alors une réponse claire à l'odeur de tachycardie (n = 6) ou de bradycardie (n = 4). Adapté de Hunt et al (1997).

Nous avons également pu observer une telle dichotomie dans la réponse respiratoire de ratons de PN22-24 lors du conditionnement de peur à l'odeur (voir Figure 53) : ces ratons ont été soumis au même protocole que celui utilisé dans notre première étude, un intervalle de 20 s séparant l'arrivée de l'odeur et celle du choc. Les réponses respiratoire et de freezing moyennes des ratons ne présentent pas de décours temporel clair. Toutefois, il est possible de distinguer 2 sous-groupes parmi les ratons de PN22-24, certains présentant une réponse respiratoire et de freezing « de type raton », soit une augmentation durable (jusqu'à 12s d'odeur environ) de la fréquence respiratoire et une diminution du freezing, d'autres présentant une réponse plus proche du « type adulte », caractérisée par une persistance du freezing associée à une diminution de la fréquence respiratoire passée la phase d'échantillonnage.

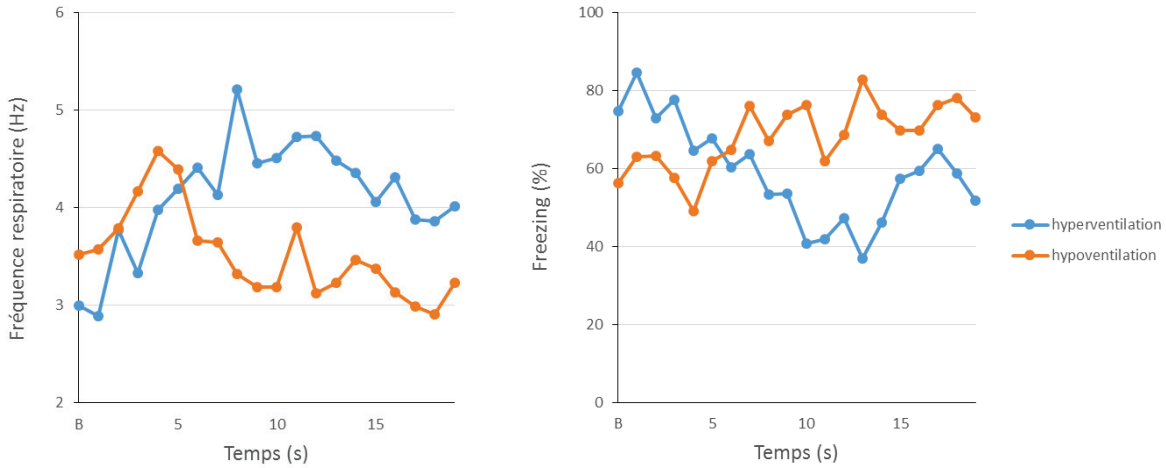


Figure 53 : Découpage du groupe de ratons de PN22-24 (n = 10) en deux sous-groupes présentant soit une hyperventilation (n = 5) caractérisée par une augmentation durable de la fréquence respiratoire du type de celle observée chez les ratons de PN12-15, soit une hypoventilation suite à une augmentation transitoire de la fréquence respiratoire (n = 5), soit un décours temporel de la respiration compatible avec la phase d'orientation observée puis la phase d'anticipation du choc observées chez les rats adultes. Ces ratons distingués sur leur réponse respiratoire présentent également des réponses de freezing distinctes qui rappelle les réponses des ratons de PN12-15 et des adultes respectivement.

V. Conclusion générale

L'ensemble de ces travaux a étudié la réponse émotionnelle du rat tout au long de son développement. Nous avons ainsi montré que la réponse émotionnelle à un stimulus conditionné est adaptée aux relations temporelles existant entre les évènements lors du conditionnement. Cette caractéristique révèle des capacités cognitives jusqu'à présent inconnues du raton : celle d'encoder la durée des intervalles de temps et d'y adapter son comportement. Une telle capacité à un âge caractérisé par la grande immaturité de certaines structures cérébrales souligne la nécessité de proposer de nouveaux modèles de la mémoire temporelle qui reposent sur les structures cérébrales déjà fonctionnelles à cet âge, notamment les structures de la mémoire associative.

L'étude de la réponse émotionnelle du rat à différents âge de la vie permet également d'en souligner les modifications au cours de l'ontogenèse et les âges transitionnels. Ces modifications

peuvent être dues à la simple maturation de l'organisme, mais elles peuvent aussi être le reflet d'un changement profond dans l'interaction de l'individu avec son environnement. Les données dont nous disposons à l'heure actuelle ne nous permettent pas de trancher en faveur de l'une ou l'autre hypothèse. D'avantage de recherche est donc nécessaire pour comprendre l'ontogenèse de la réponse émotionnelle et établir si elle admet une continuité ou au contraire est caractérisée par des stades distincts qui entrent en compétition aux âges transitionnels.

Bibliographie

Agostino PV, Cheng R-K. 2016. Contributions of dopaminergic signaling to timing accuracy and precision. *Curr Opin Behav Sci* **8**: 153–160.

Alberts JR. 2012. Olfactory Contribution to Behavioral Development in Rodents. In *Mammalian Olfaction, Reproductive Processes, and Behavior* (ed. R. Doty), Elsevier.

Alberts JR. 1984. Sensory-perceptual development in the Norway rat: A view toward comparative studies. *Comp Perspect Dev Mem* 65–101.

Alberts JR, May B. 1980. Development of nasal respiration and sniffing in the rat. *Physiol Behav* **24**: 957–963.

Alberts JR, May B. 1984. Nonnutritive, thermotactile induction of filial huddling in rat pups. *Dev Psychobiol* **17**: 161–181.

Allen TA, Furtak SC, Brown TH. 2007. Single-unit responses to 22 kHz ultrasonic vocalizations in rat perirhinal cortex. *Behav Brain Res* **182**: 327–336.

Allin JT, Banks EM. 1971. Effects of temperature on ultrasound production by infant albino rats. *Dev Psychobiol* **4**: 149–156.

Allin JT, Banks EM. 1972. Functional aspects of ultrasound production by infant albino rats (Rattus norvegicus). *Anim Behav* **20**: 175–185.

Al Maskati HA, Zbrożyna AW. 1989. Stimulation in prefrontal cortex area inhibits cardiovascular and motor components of the defence reaction in rats. *J Auton Nerv Syst* **28**: 117–125.

Altman J, Sudarshan K. 1975. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* **23**: 896–920.

Amsel A, Radek CC, Graham M, Letz R. 1977. Ultrasound emission in infant rats as an indicant of arousal during appetitive learning and extinction. *Science* **197**: 786–788.

Anagnostaras SG, Josselyn SA, Frankland PW, Silva AJ. 2000. Computer-Assisted Behavioral Assessment of Pavlovian Fear Conditioning in Mice. *Learn Mem* **7**: 58–72.

Anagnostaras SG, Wood SC, Shuman T, Cai DJ, LeDuc AD, Zurn KR, Zurn JB, Sage JR, Herrera GM. 2010. Automated Assessment of Pavlovian Conditioned Freezing and Shock Reactivity in Mice Using the Video Freeze System. *Front Behav Neurosci* **4**: 158.

Anderson AC, Patrick JR. 1934. Some early behavior patterns in the white rat. *Psychol Rev* **41**: 480–496.

Anderson JW. 1954. The production of ultrasonic sounds by laboratory rats and other mammals. *Science* **119**: 808–809.

Annese J, Schenker-Ahmed NM, Bartsch H, Maechler P, Sheh C, Thomas N, Kayano J, Ghatan A, Bresler N, Frosch MP, et al. 2014. Postmortem examination of patient H.M.'s brain based on histological sectioning and digital 3D reconstruction. *Nat Commun* **5**: 3122.

Antoniadis EA, McDonald RJ. 2000. Amygdala, hippocampus and discriminative fear conditioning to context. *Behav Brain Res* **108**: 1–19.

Antoniadis EA, McDonald RJ. 1999. Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. *Behav Brain Res* **101**: 1–13.

Antonopoulos J, Dori I, Dinopoulos A, Chiotelli M, Parnavelas JG. 2002. Postnatal development of the dopaminergic system of the striatum in the rat. *Neuroscience* **110**: 245–256.

Apicella P, Scarnati E, Ljungberg T, Schultz W. 1992. Neuronal activity in monkey striatum related to the expectation of predictable environmental events. *J Neurophysiol* **68**: 945–960.

Armony JL, Servan-Schreiber D, Romanski LM, Cohen JD, LeDoux JE. 1997. Stimulus generalization of fear responses: effects of auditory cortex lesions in a computational model and in rats. *Cereb Cortex* **7**: 157–165.

Arnsten AF, Rubia K. 2012. Neurobiological Circuits Regulating Attention, Cognitive Control, Motivation, and Emotion: Disruptions in Neurodevelopmental Psychiatric Disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **51**: 356–367.

Balsam PD, Drew MR, Gallistel CR. 2010. Time and Associative Learning. *Comp Cogn Behav Rev* **5**: 1–22.

Balsam PD, Drew MR, Yang C. 2002. Timing at the start of associative learning. *Learn Motiv* **33**: 141–155.

Balsam PD, Gallistel CR. 2009. Temporal maps and informativeness in associative learning. *Trends Neurosci* **32**: 73–8.

Balsam P, Sanchez-Castillo H, Taylor K, Van Volkinburg H, Ward RD. 2009. Timing and anticipation: conceptual and methodological approaches. *Eur J Neurosci* **30**: 1749–55.

Barfield RJ, Geyer LA. 1972. Sexual Behavior: Ultrasonic Postejaculatory Song of the Male Rat. *Science* **176**: 1349–1350.

Barnes DC, Chapuis J, Chaudhury D, Wilson DA. 2011. Odor Fear Conditioning Modifies Piriform Cortex Local Field Potentials Both during Conditioning and during Post-Conditioning Sleep. *PLoS ONE* **6**: e18130.

Barnes DC, Wilson DA. 2014. Slow-Wave Sleep-Imposed Replay Modulates Both Strength and Precision of Memory. *J Neurosci* **34**: 5134–5142.

Barr GA. 1995. Ontogeny of Nociception and Antinociception. *Natl Inst Drug Abuse Res Monogr Ser* 172–201.

Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R, Rockland C, Damasio AR. 1995. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. *Science* **269**: 1115–1118.

Beckett SRG, Duxon MS, Aspley S, Marsden CA. 1997. Central C-Fos Expression Following 20kHz/Ultrasound Induced Defence Behaviour in the Rat. *Brain Res Bull* **42**: 421–426.

Bensafi M, Porter J, Pouliot S, Mainland J, Johnson B, Zelano C, Young N, Bremner E, Aframian D, Khan R, et al. 2003. Olfactomotor activity during imagery mimics that during perception. *Nat Neurosci* **6**: 1142–1144.

Berdel B, Moryś J, Maciejewska B. 1997. Neuronal changes in the basolateral complex during development of the amygdala of the ratfn2. *Int J Dev Neurosci* **15**: 755–765.

Best AR, Wilson DA. 2003. A postnatal sensitive period for plasticity of cortical afferents but not cortical association fibers in rat piriform cortex. *Brain Res* **961**: 81–87.

Blanchard DC, Blanchard RJ. 1988. Ethoexperimental Approaches to the Biology of Emotion. *Annu Rev Psychol* **39**: 43–68.

Blanchard DC, Blanchard RJ. 1972. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J Comp Physiol Psychol* **81**: 281–290.

Blanchard RJ, Blanchard DC. 1989. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **13**: S3–S14.

Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969a. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* **67**: 370–375.

Blanchard RJ, Blanchard DC. 1971. Defensive reactions in the albino rat. *Learn Motiv* **2**: 351–362.

Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969b. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol* **68**: 129–135.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Agullana R, Weiss SM. 1991. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* **50**: 967–972.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM. 1990. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **14**: 463–472.

Blanchard RJ, Flannelly KJ, Blanchard DC. 1986. Defensive behaviors of laboratory and wild Rattus norvegicus.. *J Comp Psychol* **100**: 101–107.

Blanchard RJ, Fukunaga KK, Blanchard DC. 1976. Environmental control of defensive reactions to footshock. *Bull Psychon Soc* **8**: 129–130.

Blaze J, Asok A, Roth TL. 2015. The long-term impact of adverse caregiving environments on epigenetic modifications and telomeres. *Front Behav Neurosci* **9**: 79.

Bloch S. 1989. Emotion ressentie, émotion recrée. *Science et Vie - Hors-série*, September.

Blumberg MS, Alberts JR. 1991. On the significance of similarities between ultrasonic vocalizations of infant and adult rats. *Neurosci Biobehav Rev* **15**: 383–390.

Blumberg MS, Alberts JR. 1990. Ultrasonic vocalizations by rat pups in the cold: an acoustic by-product of laryngeal braking? *Behav Neurosci* **104**: 808.

Blumberg MS, Efimova IV, Alberts JR. 1992. Ultrasonic vocalizations by rat pups: The primary importance of ambient temperature and the thermal significance of contact comfort. *Dev Psychobiol* **25**: 229–250.

Blumberg MS, Sokoloff G, Kent KJ. 2000. A developmental analysis of clonidine's effects on cardiac rate and ultrasound production in infant rats. *Dev Psychobiol* **36**: 186–193.

Boiten FA. 1998. The effects of emotional behaviour on components of the respiratory cycle. *Biol Psychol* **49**: 29–51.

Boiten FA, Frijda NH, Wientjes CJE. 1994. Emotions and respiratory patterns: review and critical analysis. *Int J Psychophysiol* **17**: 103–128.

Bolles RC. 1970. Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychol Rev* **77**: 32–48.

Bolles RC, Collier AC. 1976. The effect of predictive cues on freezing in rats. *Anim Learn Behav* **4**: 6–8.

Bolles RC, Fanselow MS. 1980. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav Brain Sci* **3**: 291–301.

Bolles RC, Woods PJ. 1964. The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Anim Behav* **12**: 427–441.

Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers JL, Londen E, Rousselot J, Szyba K, Thévenet M, Sullivan-Wilson TA, Doyère V, Sullivan RM, et al. 2014. Infant rats can learn time intervals before the maturation of the striatum: evidence from odor fear conditioning. *Front Behav Neurosci* **8**: 176.

Boulanger Bertolus J, Knippenberg J, Verschueren A, Le Blanc P, Brown BL, Mouly A-M, Doyère V. 2015. Timing behavior in auditory fear conditioning: Stimulus property matters. *Int J Comp Psychol* -.

Bouton ME, Bolles RC. 1980. Conditioned fear assessed by freezing and by the suppression of three different baselines. *Anim Learn Behav* **8**: 429–434.

Bowlby J. 1969. *Attachment, Vol. 1 of Attachment and loss*. New York: Basic Books.

Brake SC. 1981. Suckling infant rats learn a preference for a novel olfactory stimulus paired with milk delivery. *Science* **211**: 506–508.

Branchi I, Santucci D, Alleva E. 2001. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav Brain Res* **125**: 49–56.

Brechbühl J, Klaey M, Broillet M-C. 2008. Grueneberg Ganglion Cells Mediate Alarm Pheromone Detection in Mice. *Science* **321**: 1092–1095.

Brewster J, Leon M. 1980. Relocation of the site of mother–young contact: Maternal transport behavior in Norway rats. *J Comp Physiol Psychol* **94**: 69–79.

Bronstein PM, Hirsch SM. 1976. Ontogeny of defensive reactions in Norway rats. *J Comp Physiol Psychol* **90**: 620–629.

Brouette-Lahlou I, Vernet-Maury E, Vigouroux M. 1992. Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: pups' anogenital licking. *Behav Brain Res* **50**: 147–154.

Brown JS, Kalish HI, E I. 1951. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol* **41**: 317–328.

Brudzynski SM. 2010. Chapter 7.3 - Medial cholinoceptive vocalization strip in the cat and rat brains: initiation of defensive vocalizations. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (ed. S.M. Brudzynski), Vol. 19 of *Handbook of Mammalian VocalizationAn Integrative Neuroscience Approach*, pp. 69–76, Elsevier.

Brudzynski SM. 2013. Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Curr Opin Neurobiol* **23**: 310–317.

Brudzynski SM. 2015. Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Curr Neuropharmacol* **13**: 180–192.

Brudzynski SM. 1994. Ultrasonic vocalization induced by intracerebral carbachol in rats: Localization and a dose-response study. *Behav Brain Res* **63**: 133–143.

Brudzynski SM, Barnabi F. 1996. Contribution of the ascending cholinergic pathways in the production of ultrasonic vocalization in the rat. *Behav Brain Res* **80**: 145–152.

Brudzynski SM, Bihari F. 1990. Ultrasonic vocalization in rats produced by cholinergic stimulation of the brain. *Neurosci Lett* **109**: 222–226.

Brudzynski SM, Bihari F, Ociepa D, Fu X. 1993. Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: long and short calls. *Physiol Behav* **54**: 215–221.

Brudzynski SM, Chiu E. 1995. Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiol Behav* **57**: 1039–1044.

Brudzynski SM, Fletcher NH. 2010. Chapter 3.3 - Rat ultrasonic vocalization: short-range communication. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (ed. S.M. Brudzynski), Vol. 19 of *Handbook of Mammalian VocalizationAn Integrative Neuroscience Approach*, pp. 69–76, Elsevier.

Brudzynski SM, Kehoe P, Callahan M. 1999. Sonographic structure of isolation-induced ultrasonic calls of rat pups. *Dev Psychobiol* **34**: 195–204.

Brudzynski SM, Ociepa D. 1992. Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. *Physiol Behav* **52**: 655–660.

Brunelli SA. 2005. Selective Breeding for an Infant Phenotype: Rat Pup Ultrasonic Vocalization (USV). *Behav Genet* **35**: 53–65.

Brunelli SA, Shair HN, Hofer MA. 1994. Hypothermic vocalizations of rat pups (Rattus norvegicus) and direct maternal search behavior. *J Comp Psychol* **108**: 298–303.

Brunelli SA, Vinocur DD, Soo-Hoo D, Hofer MA. 1997. Five generations of selective breeding for ultrasonic vocalization (USV) responses in N:NIH strain rats. *Dev Psychobiol* **31**: 255–265.

Buck CL, Vendruscolo LF, Koob GF, George O. 2013. Dopamine D1 and μ-opioid receptor antagonism blocks anticipatory 50 kHz ultrasonic vocalizations induced by palatable food cues in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* **231**: 929–937.

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

Bueti D. 2011. The sensory representation of time. *Front Integr Neurosci* 34.

Buhusi CV, Meck WH. 2005. What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. *Nat Rev Neurosci* **6**: 755–765.

Buonviso N, Amat C, Litaudon P. 2006. Respiratory Modulation of Olfactory Neurons in the Rodent Brain. *Chem Senses* **31**: 145–154.

Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J. 2000. Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. *Behav Neurosci* **114**: 320–327.

Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J, Ikemoto S. 2001a. Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. *Behav Neurosci* **115**: 940–944.

Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J, Shippenberg TS. 2001b. Evaluation of rat ultrasonic vocalizations as predictors of the conditioned aversive effects of drugs. *Psychopharmacology (Berl)* **155**: 35–42.

Burgdorf J, Kroes RA, Moskal JR, Pfaus JG, Brudzynski SM, Panksepp J. 2008. Ultrasonic vocalizations of rats (Rattus norvegicus) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J Comp Psychol* **122**: 357.

Burgdorf J, Panksepp J. 2001. Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol Behav* **72**: 167–173.

Burgdorf J, Wood PL, Kroes RA, Moskal JR, Panksepp J. 2007. Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behav Brain Res* **182**: 274–283.

Buron G. 2009. Effets de l'exposition à des substances volatiles toxiques sur les neuroépithéliums olfactif principal et voméronasal: Approches comportementale, histologique et immunohistochimique chez la souris. phdthesis, Université de Franche-Comté, Besançon.

Cahill L, McGaugh JL, Weinberger NM. 2001. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci* **24**: 578–581.

Callaghan BL, Sullivan RM, Howell B, Tottenham N. 2014. The international society for developmental psychobiology Sackler symposium: Early adversity and the maturation of emotion circuits - A cross-species analysis. *Dev Psychobiol* **56**: 1635–1650.

Callaghan BL, Tottenham N. 2016. The Neuro-Environmental Loop of Plasticity: A Cross-Species Analysis of Parental Effects on Emotion Circuitry Development Following Typical and Adverse Caregiving. *Neuropsychopharmacology* **41**: 163–176.

Campeau S, Davis M. 1995. Involvement of subcortical and cortical afferents to the lateral nucleus of the amygdala in fear conditioning measured with fear- potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. *J Neurosci* **15**: 2312–2327.

Campeau S, Miserendino MJ, Davis M. 1992. Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5 blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. *Behav Neurosci* **106**: 569–574.

Camp LL, Rudy JW. 1988. Changes in the categorization of appetitive and aversive events during postnatal development of the rat. *Dev Psychobiol* **21**: 25–42.

Carr WJ, Yee L, Gable D, Marasco E. 1976. Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. *J Comp Physiol Psychol* **90**: 821–828.

Chabout J, Serreau P, Ey E, Bellier L, Aubin T, Bourgeron T, Granon S. 2012. Adult Male Mice Emit Context-Specific Ultrasonic Vocalizations That Are Modulated by Prior Isolation or Group Rearing Environment. *PLOS ONE* **7**: e29401.

Chareyron LJ, Lavenex PB, Lavenex P. 2012. Postnatal development of the amygdala: A stereological study in rats. *J Comp Neurol* **520**: 3745–3763.

Church RM, Deluty MZ. 1977. Bisection of temporal intervals. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **3**: 216–228.

Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. 2001. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* **105**: 7–17.

Claparède E. 1995. Recognition and Selfhood. *Conscious Cogn* **4**: 371–378.

Clarke S, Trowill JA. 1971. Sniffing and motivated behavior in the rat. *Physiol Behav* **6**: 49–52.

Clayton NS, Dickinson A. 1998. Episodic-like memory during cache recovery by scrub jays. *Nature* **395**: 272–274.

Cohen L, Rothschild G, Mizrahi A. 2011. Multisensory Integration of Natural Odors and Sounds in the Auditory Cortex. *Neuron* **72**: 357–369.

Collier AC, Bolles RC. 1980. The ontogenesis of defensive reactions to shock in preweanling rats. *Dev Psychobiol* **13**: 141–150.

Corkin S. 1968. Acquisition of motor skill after bilateral medial temporal-lobe excision. *Neuropsychologia* **6**: 255–265.

Corona R, Lévy F. 2015. Chemical olfactory signals and parenthood in mammals. *Horm Behav* **68**: 77–90.

Coull JT, Cheng R-K, Meck WH. 2011. Neuroanatomical and Neurochemical Substrates of Timing. *Neuropsychopharmacology* **36**: 3–25.

Coureaud G, Moncomble A-S, Montigny D, Dewas M, Perrier G, Schaal B. 2006. A Pheromone That Rapidly Promotes Learning in the Newborn. *Curr Biol* **16**: 1956–1961.

Courtiol E. 2012. L'inextricable relation olfaction-respiration chez le rat : études de l'impact des variations de flairages sur l'activité du bulbe olfactif et sur la discrimination des odeurs. phdthesis, Université Claude Bernard - Lyon I https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01070877/document.

Cousens G, Otto T. 1998. Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **112**: 1092–1103.

Covington III HE, Miczek KA. 2003. Vocalizations during withdrawal from opiates and cocaine: possible expressions of affective distress. *Eur J Pharmacol* **467**: 1–13.

Crain B, Cotman C, Taylor D, Lynch G. 1973. A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res* **63**: 195–204.

Crawford M, Materson FA. 1982. Species-specific defense reactions and avoidance learning. An evaluative review. *Pavlov J Biol Sci Off J Pavlov* **17**: 204–14.

Cuomo V, Cagiano R, De Salvia MA, Maselli MA, Renna G, Racagni G. 1988. Ultrasonic vocalization in response to unavoidable aversive stimuli in rats: Effects of benzodiazepines. *Life Sci* **43**: 485–491.

Damásio AR. 2003. L'esprit est modelé par le corps. *La Recherche - L'actualité des sciences*, October.

Darvas M, Fadok JP, Palmiter RD. 2011. Requirement of dopamine signaling in the amygdala and striatum for learning and maintenance of a conditioned avoidance response. *Learn Mem* **18**: 136–143.

Davis M. 1979. Diazepam and flurazepam: Effects on conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* **62**: 1–7.

Davis M. 1992a. The Role of the Amygdala in Fear and Anxiety. *Annu Rev Neurosci* **15**: 353–375.

Davis M. 1992b. The role of the amygdala in fear-potentiated startle: implications for animal models of anxiety. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 35–41.

Davis M, Schlesinger LS, Sorenson CA. 1989. Temporal specificity of fear conditioning: effects of different conditioned stimulus-unconditioned stimulus intervals on the fear-potentiated startle effect. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **15**: 295–310.

Davison AN, Dobbing J. 1966. Myelination as a Vulnerable Period in Brain Development. *Br Med Bull* **22**: 40–44.

Deffains M, Legallet E, Apicella P. 2011. Importance of the temporal structure of movement sequences on the ability of monkeys to use serial order information. *Exp Brain Res* **214**: 415–425.

Deshmukh SS, Bhalla US. 2003. Representation of Odor Habituation and Timing in the Hippocampus. *J Neurosci* **23**: 1903–1915.

Dìaz-Mataix L, Ruiz Martinez RC, Schafe GE, LeDoux JE, Doyère V. 2013. Detection of a Temporal Error Triggers Reconsolidation of Amygdala-Dependent Memories. *Curr Biol* **23**: 467–472.

Díaz-Mataix L, Tallot L, Doyère V. 2014. The amygdala: A potential player in timing CS–US intervals. *Behav Processes* **101**: 112–122.

Do-Monte FH, Quiñones-Laracuente K, Quirk GJ. 2015. A temporal shift in the circuits mediating retrieval of fear memory. *Nature* **519**: 460–463.

Doyère V, Dębiec J, Monfils M-H, Schafe GE, LeDoux JE. 2007. Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. *Nat Neurosci* **10**: 414–416.

Drew MR, Fairhurst S, Malapani C, Horvitz JC, Balsam PD. 2003. Effects of dopamine antagonists on the timing of two intervals. *Pharmacol Biochem Behav* **75**: 9–15.

Drew MR, Simpson EH, Kellendonk C, Herzberg WG, Lipatova O, Fairhurst S, Kandel ER, Malapani C, Balsam PD. 2007. Transient Overexpression of Striatal D2 Receptors Impairs Operant Motivation and Interval Timing. *J Neurosci* **27**: 7731–7739.

Drew MR, Zupan B, Cooke A, Couvillon PA, Balsam PD. 2005. Temporal control of conditioned responding in goldfish. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **31**: 31–9.

Duchamp-Viret P, Chaput MA, Duchamp A. 1999. Odor Response Properties of Rat Olfactory Receptor Neurons. *Science* **284**: 2171–2174.

Dutschmann M, Mörschel M, Rybak IA, Dick TE. 2009. Learning to breathe: control of the inspiratory–expiratory phase transition shifts from sensory- to central-dominated during postnatal development in rats. *J Physiol* **587**: 4931–4948.

Du Y, Ping J, Li N, Wu X, Li L, Galbraith G. 2007. Ultrasonic evoked responses in rat cochlear nucleus. *Brain Res* **1172**: 40–47.

Edeline J-M, Dutrieux G, Neuenschwander-El Massioui N. 1988. Multiunit changes in hippocampus and medial geniculate body in free-behaving rats during acquisition and retention of a conditioned response to a tone. *Behav Neural Biol* **50**: 61–79.

Edwards DA, Walter B, Liang P. 1996. Hypothalamic and Olfactory Control of Sexual Behavior and Partner Preference in Male Rats. *Physiol Behav* **60**: 1347–1354.

Ehret G. 1987. Left hemisphere advantage in the mouse brain for recognizing ultrasonic communication calls. *Nature* **325**: 249–251.

Ehret G, Koch M, Haack B, Markl H. 1987. Sex and parental experience determine the onset of an instinctive behavior in mice. *Naturwissenschaften* **74**: 47–47.

Ehrlich DE, Ryan SJ, Hazra R, Guo J-D, Rainnie DG. 2013. Postnatal maturation of GABAergic transmission in the rat basolateral amygdala. *J Neurophysiol* **110**: 926–941.

Ehrlich DE, Ryan SJ, Rainnie DG. 2012. Postnatal development of electrophysiological properties of principal neurons in the rat basolateral amygdala. *J Physiol* **590**: 4819–4838.

Eichenbaum H. 2013. Memory on time. *Trends Cogn Sci* **17**: 81–88.

Eichenbaum H, Kuperstein M, Fagan A, Nagode J. 1987. Cue-sampling and goal-approach correlates of hippocampal unit activity in rats performing an odor-discrimination task. *J Neurosci* **7**: 716–732.

Emerich DF, Scalzo FM, Enters EK, Spear NE, Spear LP. 1985. Effects of 6-hydroxydopamine-induced catecholamine depletion on shock-precipitated wall climbing of infant rat pups. *Dev Psychobiol* **18**: 215–227.

Endres T, Widmann K, Fendt M. 2007. Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals? *Behav Brain Res* **185**: 69–75.

Ergorul C, Eichenbaum H. 2004. The Hippocampus and Memory for “What,” “Where,” and “When.” *Learn Mem* **11**: 397–405.

Es-seddiqi M, Massioui NE, Samson N, Brown BL, Doyère V. 2016. The amygdalo-nigrostriatal network is critical for an optimal temporal performance. *Learn Mem* **23**: 104–107.

Estes WK, Skinner BF. 1941. Some quantitative properties of anxiety. *J Exp Psychol* **29**: 390–400.

Falls WA, Davis M. 1995. Lesions of the central nucleus of the amygdala block conditioned excitation, but not conditioned inhibition of fear as measured with the fear-potentiated startle effect. *Behav Neurosci* **109**: 379–387.

Fanselow MS. 1980. Conditional and unconditional components of post-shock freezing. *Pavlov J Biol Sci Off J Pavlov* **15**: 177–182.

Fanselow MS. 1990. Factors governing one-trial contextual conditioning. *Anim Learn Behav* **18**: 264–270.

Fanselow MS. 1994. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon Bull Rev* **1**: 429–438.

Fanselow MS, Kim JJ. 1994. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* **108**: 210–212.

Fanselow MS, LeDoux JE. 1999. Why We Think Plasticity Underlying Pavlovian Fear Conditioning Occurs in the Basolateral Amygdala. *Neuron* **23**: 229–232.

Fanselow MS, Rudy JW. 1998. Convergence of Experimental and Developmental Approaches to Animal Learning and Memory Processes. In *Mechanistic Relationships Between Development and Learning* (eds. T.J. Carew, R. Menzel, and C.J. Shatz), pp. 15–28, Wiley, New York.

Farrell WJ, Alberts JR. 2000. Ultrasonic vocalizations by rat pups after adrenergic manipulations of brown fat metabolism. *Behav Neurosci* **114**: 805–813.

Fehr B, Russell JA. 1984. Concept of emotion viewed from a prototype perspective. *J Exp Psychol Gen* **113**: 464.

Feinstein JS, Adolphs R, Damasio A, Tranel D. 2011. The Human Amygdala and the Induction and Experience of Fear. *Curr Biol* **21**: 34–38.

Fellini L, Morellini F. 2013. Mice Create What–Where–When Hippocampus-Dependent Memories of Unique Experiences. *J Neurosci* **33**: 1038–1043.

Ferreira TL, Moreira KM, Ikeda DC, Bueno OFA, Oliveira MGM. 2003. Effects of dorsal striatum lesions in tone fear conditioning and contextual fear conditioning. *Brain Res* **987**: 17–24.

Ferreira TL, Shammah-Lagnado SJ, Bueno OFA, Moreira KM, Fornari RV, Oliveira MGM. 2008. The indirect amygdala–dorsal striatum pathway mediates conditioned freezing: Insights on emotional memory networks. *Neuroscience* **153**: 84–94.

Finck C, Lejeune L. 2010. Chapter 10.2 - Structure and oscillatory function of the vocal folds. In *Handbook of Mammalian Vocalization: An Integrative Neuroscience Approach* (ed. S.M. Brudzynski), Vol. 19 of *Handbook of Behavioral Neuroscience*, pp. 427–438, Elsevier.

Firestein S. 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* **413**: 211–218.

Fitzgerald M. 2005. The development of nociceptive circuits. *Nat Rev Neurosci* **6**: 507–520.

Fitzgerald M, Gibson S. 1984. The postnatal physiological and neurochemical development of peripheral sensory C fibres. *Neuroscience* **13**: 933–944.

Fletcher ML, Smith AM, Best AR, Wilson DA. 2005. High-Frequency Oscillations Are Not Necessary for Simple Olfactory Discriminations in Young Rats. *J Neurosci* **25**: 792–798.

Franks KM, Isaacson JS. 2005. Synapse-Specific Downregulation of NMDA Receptors by Early Experience: A Critical Period for Plasticity of Sensory Input to Olfactory Cortex. *Neuron* **47**: 101–114.

Freeman WJ, Viana di Prisco G, Wesley G, Whitney TM. 1983. Conditioning of relative frequency of sniffing by rabbits to odors. *J Comp Psychol* **97**: 12–23.

Frysztak RJ, Neafsey EJ. 1991. The Effect of Medial Frontal Cortex Lesions on Respiration, “Freezing,” and Ultrasonic Vocalizations during Conditioned Emotional Responses in Rats. *Cereb Cortex* **1**: 418–425.

Gaffan D. 1974. Recognition impaired and association intact in the memory of monkeys after transection of the fornix. *J Comp Physiol Psychol* **86**: 1100–1109.

Garcia EJ, McCowan TJ, Cain ME. 2015. Harmonic and frequency modulated ultrasonic vocalizations reveal differences in conditioned and unconditioned reward processing. *Behav Brain Res* **287**: 207–214.

Gardner CR. 1985. Distress vocalization in rat pups a simple screening method for anxiolytic drugs. *J Pharmacol Methods* **14**: 181–187.

Gilles EE, Schultz L, Baram TZ. 1996. Abnormal corticosterone regulation in an immature rat model of continuous chronic stress. *Pediatr Neurol* **15**: 114–119.

Goosens KA, Maren S. 2001. Contextual and Auditory Fear Conditioning are Mediated by the Lateral, Basal, and Central Amygdaloid Nuclei in Rats. *Learn Mem* **8**: 148–155.

Gordon CJ. 1990. Thermal biology of the laboratory rat. *Physiol Behav* **47**: 963–991.

Gouvêa TS, Monteiro T, Motiwala A, Soares S, Machens C, Paton JJ. 2015. Striatal dynamics explain duration judgments. *eLife* **4**: e11386.

Graham FK, Clifton RK. 1966. Heart-rate change as a component of the orienting response. *Psychol Bull* **65**: 305–320.

Grossen NE, Kelley MJ. 1972. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol* **81**: 307–310.

Grosso A, Cambiaghi M, Concina G, Sacco T, Sacchetti B. 2015. Auditory cortex involvement in emotional learning and memory. *Neuroscience* **299**: 45–55.

Haroutunian V, Campbell BA. 1979. Emergence of interoceptive and exteroceptive control of behavior in rats. *Science* **205**: 927–929.

Harris GC, Fitzgerald RD. 1991. Locus coeruleus involvement in the learning of classically conditioned bradycardia. *J Neurosci* **11**: 2314–2320.

Hashimoto H, Moritani N, Katou M, Nishiya T, Kromkhun P, Yokosuka M, Tanaka M, Saito TR. 2007. Ontogenetic changes of ultrasonic vocalizations emitted from infant rats. *Exp Anim Jpn Assoc Lab Anim Sci* **56**: 315–318.

Hashimoto H, Saito TR, Furudate S, Takahashi KW. 2001. Prolactin Levels and Maternal Behavior Induced by Ultrasonic Vocalizations of the Rat Pup. *Exp Anim* **50**: 307–312.

Hass J, Durstewitz D. 2014. Neurocomputational Models of Time Perception. In *Neurobiology of Interval Timing* (eds. H. Merchant and V. De Lafuente), Vol. 829 of, pp. 49–71, Springer New York, New York, NY.

Hegoburu C. 2012. Le réseau impliqué dans la mémoire de peur à l’odeur chez le rat : Dynamique des interactions entre le cortex olfactif et l’amygdale. phdthesis, Université Claude Bernard - Lyon I.

Hegoburu C, Parrot S, Ferreira G, Mouly A-M. 2014. Differential involvement of amygdala and cortical NMDA receptors activation upon encoding in odor fear memory. *Learn Mem* **21**: 651–655.

Hegoburu C, Sevelinges Y, Thévenet M, Gervais R, Parrot S, Mouly A-M. 2009. Differential dynamics of amino acid release in the amygdala and olfactory cortex during odor fear acquisition as revealed with simultaneous high temporal resolution microdialysis. *Learn Mem* **16**: 687–697.

Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Mouly A-M. 2011. The RUB cage: respiration–ultrasonic vocalizations–behavior acquisition setup for assessing emotional memory in rats. *Front Behav Neurosci* **5**: 25.

Heim C, Nemeroff CB. 1999. The impact of early adverse experiences on brain systems involved in the pathophysiology of anxiety and affective disorders. *Biol Psychiatry* **46**: 1509–1522.

Heimer L, Larsson K. 1967. Mating behavior of male rats after olfactory bulb lesions. *Physiol Behav* **2**: 207–209.

Helfer ME, Kempe RS, Krugman RD. 1999. *The Battered Child*. University of Chicago Press.

Helmstetter FJ, Bellgowan PS. 1994. Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. *Behav Neurosci* **108**: 1005–1009.

Herzog C, Otto T. 1997. Odor-guided fear conditioning in rats: 2. Lesions of the anterior perirhinal cortex disrupt fear conditioned to the explicit conditioned stimulus but not to the training context. *Behav Neurosci* **111**: 1265–1272.

Himmler BT, Kisko TM, Euston DR, Kolb B, Pellis SM. 2014. Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? I. Evidence from the timing and context of their use. *Behav Processes* **106**: 60–66.

Hodgson RA, Guthrie DH, Varty GB. 2008. Duration of ultrasonic vocalizations in the isolated rat pup as a behavioral measure: Sensitivity to anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacol Biochem Behav* **88**: 341–348.

Hofer MA, Brunelli SA, Shair HN. 1993. Ultrasonic vocalization responses of rat pups to acute separation and contact comfort do not depend on maternal thermal cues. *Dev Psychobiol* **26**: 81–95.

Hofer MA, Masmela JR, Brunelli SA, Shair HN. 1998. The ontogeny of maternal potentiation of the infant rats' isolation call. *Dev Psychobiol* **33**: 189–201.

Hofer MA, Shair H. 1978. Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-week-old rats. *Dev Psychobiol* **11**: 495–504.

Hofer MA, Shair HN. 1992. Ultrasonic vocalization by rat pups during recovery from deep hypothermia. *Dev Psychobiol* **25**: 511–528.

Hofer MA, Shair HN, Brunelli SA. 2001. Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. In *Current Protocols in Neuroscience*, John Wiley & Sons, Inc.

Hofer MA, Shair H, Singh P. 1976. Evidence that maternal ventral skin substances promote suckling in infant rats. *Physiol Behav* **17**: 131–136.

Höhn S, Dallérac G, Faure A, Urbach YK, Nguyen HP, Riess O, Hörsten S von, Blanc PL, Desvignes N, Massioui NE, et al. 2011. Behavioral and In Vivo Electrophysiological Evidence for Presymptomatic Alteration of Prefrontostriatal Processing in the Transgenic Rat Model for Huntington Disease. *J Neurosci* **31**: 8986–8997.

Homma I, Masaoka Y. 2008. Breathing rhythms and emotions. *Exp Physiol* **93**: 1011–1021.

Hubbard DT, Blanchard DC, Yang M, Markham CM, Gervacio A, Chun-I L, Blanchard RJ. 2004. Development of defensive behavior and conditioning to cat odor in the rat. *Physiol Behav* **80**: 525–530.

Hunt PS. 1997. Retention of conditioned autonomic and behavioral responses in preweanling rats: Forgetting and reinstatement. *Anim Learn Behav* **25**: 301–311.

Hunt PS, Campbell BA. 1997. Developmental dissociation of the components of conditioned fear. In *Learning, motivation, and cognition: The functional behaviorism of Robert C. Bolles* (eds. M.E. Bouton and M.S. Fanselow), pp. 53–74, American Psychological Association, Washington, DC, US.

Hunt PS, Hess MF, Campbell BA. 1997. Conditioned cardiac and behavioral response topography to an olfactory CS dissociates with age. *Anim Learn Behav* **25**: 53–61.

Hunt PS, Richardson R, Campbell BA. 1994. Delayed development of fear-potentiated startle in rats. *Behav Neurosci* **108**: 69–80.

Ihnat R, White NR, Barfield RJ. 1995. Pup's broadband vocalizations and maternal behavior in the rat. *Behav Processes* **33**: 257–271.

Insel TR, Hill JL. 1987. Infant separation distress in genetically fearful rats. *Biol Psychiatry* **22**: 786–789.

Insel TR, Hill JL, Mayor RB. 1986. Rat pup ultrasonic isolation calls: Possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. *Pharmacol Biochem Behav* **24**: 1263–1267.

Ise S, Ohta H. 2009. Power spectrum analysis of ultrasonic vocalization elicited by maternal separation in rat pups. *Brain Res* **1283**: 58–64.

Ivkovich D, Paczkowski CM, Stanton ME. 2000. Ontogeny of delay versus trace eyeblink conditioning in the rat. *Dev Psychobiol* **36**: 148–160.

Iwata J, Chida K, LeDoux JE. 1987. Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. *Brain Res* **418**: 183–188.

James H, Binks C. 1963. Escape and Avoidance Learning in Newly Hatched Domestic Chicks. *Science* **139**: 1293–1294.

Jans JE, Leon M. 1983. Determinants of mother-young contact in Norway rats. *Physiol Behav* **30**: 919–935.

Jarrell TW, Gentile CG, Romanski LM, McCabe PM, Schneiderman N. 1987. Involvement of cortical and thalamic auditory regions in retention of differential bradycardiac conditioning to acoustic conditioned stimuli in rabbits. *Brain Res* **412**: 285–294.

Jelen P, Soltysik S, Zagrodzka J. 2003. 22-kHz Ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behav Brain Res* **141**: 63–72.

Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. 2011. Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory. *Cell* **147**: 509–524.

Johanson IB, Hall WG. 1979. Appetitive learning in 1-day-old rat pups. *Science* **205**: 419–421.

Johanson IB, Teicher MH. 1980. Classical conditioning of an odor preference in 3-day-old rats. *Behav Neural Biol* **29**: 132–136.

Johnson BA, Woo CC, Duong H, Nguyen V, Leon M. 1995. A learned odor evokes an enhanced Fos-like glomerular response in the olfactory bulb of young rats. *Brain Res* **699**: 192–200.

Jones SV, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ. 2007. Differential regional expression of brain-derived neurotrophic factor following olfactory fear learning. *Learn Mem* **14**: 816–820.

Kabitzke PA, Wiedenmayer CP. 2011. Effects of the stimulus and chamber size on unlearned fear across development. *Behav Processes* **86**: 257–262.

Kaltwasser MT. 1990. Startle-inducing acoustic stimuli evoke ultrasonic vocalization in the rat. *Physiol Behav* **48**: 13–17.

Kapp BS, Gallagher M, Underwood MD, McNall CL, Whitehorn D. 1982. Cardiovascular responses elicited by electrical stimulation of the amygdala central nucleus in the rabbit. *Brain Res* **234**: 251–262.

Kehoe P, Callahan M, Daigle A, Mallinson K, Brudzynski S. 2001. The effect of cholinergic stimulation on rat pup ultrasonic vocalizations. *Dev Psychobiol* **38**: 92–100.

Kehoe P, Harris JC. 1989. Ontogeny of noradrenergic effects on ultrasonic vocalizations in rat pups. *Behav Neurosci* **103**: 1099–1107.

Kelly JB, Masterton B. 1977. Auditory sensitivity of the albino rat. *J Comp Physiol Psychol* **91**: 930–936.

Kepecs A, Uchida N, Mainen ZF. 2007. Rapid and Precise Control of Sniffing During Olfactory Discrimination in Rats. *J Neurophysiol* **98**: 205–213.

Killcross S, Robbins TW, Everitt BJ. 1997. Different types of fear-conditioned behaviour mediated by separate nuclei within amygdala. *Nature* **388**: 377–380.

Kilpatrick L, Cahill L. 2003. Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* **117**: 184–188.

Kim EJ, Kim ES, Covey E, Kim JJ. 2010. Social Transmission of Fear in Rats: The Role of 22-kHz Ultrasonic Distress Vocalization. *PLoS ONE* **5**: e15077.

Kim H, Bao S. 2013. Experience-dependent overrepresentation of ultrasonic vocalization frequencies in the rat primary auditory cortex. *J Neurophysiol* **110**: 1087–1096.

Kim J, Ghim J-W, Lee JH, Jung MW. 2013. Neural Correlates of Interval Timing in Rodent Prefrontal Cortex. *J Neurosci* **33**: 13834–13847.

Kim JH, Richardson R. 2010. New Findings on Extinction of Conditioned Fear Early in Development: Theoretical and Clinical Implications. *Biol Psychiatry* **67**: 297–303.

Kim JJ, Fanselow MS. 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* **256**: 675–677.

Kim J, Jung AH, Byun J, Jo S, Jung MW, Kim J, Jung AH, Byun J, Jo S, Jung MW. 2009. Inactivation of medial prefrontal cortex impairs time interval discrimination in rats. *Front Behav Neurosci* **3**: 38.

King EC, Pattwell SS, Glatt CE, Lee FS. 2014. Sensitive periods in fear learning and memory. *Stress* **17**: 13–21.

Kirkpatrick K, Balsam PD. 2016. Associative learning and timing. *Curr Opin Behav Sci* **8**: 181–185.

Kishioka A, Fukushima F, Ito T, Kataoka H, Mori H, Ikeda T, Itohara S, Sakimura K, Mishina M. 2009. A Novel Form of Memory for Auditory Fear Conditioning at a Low-Intensity Unconditioned Stimulus. *PLOS ONE* **4**: e4157.

Kisko TM, Euston DR, Pellis SM. 2015a. Are 50-khz calls used as play signals in the playful interactions of rats? III. The effects of devocalization on play with unfamiliar partners as juveniles and as adults. *Behav Processes* **113**: 113–121.

Kisko TM, Himmler BT, Himmler SM, Euston DR, Pellis SM. 2015b. Are 50-kHz calls used as play signals in the playful interactions of rats? II. Evidence from the effects of devocalization. *Behav Processes* **111**: 25–33.

Kleitman N, Satinoff E. 1982. Thermoregulatory behavior in rat pups from birth to weaning. *Physiol Behav* **29**: 537–541.

Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. 1998. Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *J Comp Psychol* **112**: 65–73.

Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. 1999. High-Frequency Ultrasonic Vocalizations Index Conditioned Pharmacological Reward in Rats. *Physiol Behav* **66**: 639–643.

Kononowicz TW. 2015. Dopamine-dependent oscillations in frontal cortex index “start-gun” signal in interval timing. *Front Hum Neurosci* **9**: 331.

Koss WA, Belden CE, Hristov AD, Juraska JM. 2014. Dendritic remodeling in the adolescent medial prefrontal cortex and the basolateral amygdala of male and female rats. *Synapse* **68**: 61–72.

Kovach JK, Hess EH. 1963. Imprinting: Effects of painful stimulation upon the following response. *J Comp Physiol Psychol* **56**: 461–464.

Kraebel KS, Brasser SM, Campbell JO, Spear LP, Spear NE. 2002. Developmental differences in temporal patterns and potentiation of isolation-induced ultrasonic vocalizations: Influence of temperature variables. *Dev Psychobiol* **40**: 147–159.

Kucharski D, Spear NE. 1984. Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Dev Psychobiol* **17**: 465–479.

LaBarbera JD, Church RM. 1974. Magnitude of fear as a function of expected time to all aversive event. *Anim Learn Behav* **2**: 199–202.

Lahvis GP, Alleva E, Scattoni ML. 2011. Translating mouse vocalizations: prosody and frequency modulation1. *Genes Brain Behav* **10**: 4–16.

LeDoux J. 2007. The amygdala. *Curr Biol* **17**: R868–R874.

LeDoux JE. 2014. Coming to terms with fear. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 2871–2878.

LeDoux JE. 1996. *The emotional brain: the mysterious underpinnings of emotional life*. Simon & Schuster, New York.

LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM. 1990. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. *J Neurosci* **10**: 1062–1069.

Lejeune H. 1992. Response timing and development: Fixed-interval performance in precociously weaned rats. *Q J Exp Psychol Sect B* **44**: 101–122.

Lester LS, Fanselow MS. 1985. Exposure to a cat produces opioid analgesia in rats. *Behav Neurosci* **99**: 756–759.

Levine S. 1994. The Ontogeny of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. The Influence of Maternal Factorsa. *Ann N Y Acad Sci* **746**: 275–288.

Levine S. 1970. The pituitary-adrenal system and the developing brain. In *Pituitary, Adrenal and the Brain* (eds. D. De Wied and J.A.W.M. Weijnen), *Progress in Brain Research*, Elsevier.

Lévy F, Keller M. 2009. Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behav Brain Res* **200**: 336–345.

Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC. 1980. Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. *Science* **208**: 623–625.

Ley R. 1999. The Modification of Breathing Behavior Pavlovian and Operant Control in Emotion and Cognition. *Behav Modif* **23**: 441–479.

Li A, Gire DH, Bozza T, Restrepo D. 2014. Precise Detection of Direct Glomerular Input Duration by the Olfactory Bulb. *J Neurosci* **34**: 16058–16064.

Liang KC. 1998. Pretraining infusion of DSP-4 into the amygdala impaired retention in the inhibitory avoidance task: involvement of norepinephrine but not serotonin in memory facilitation. *Chin J Physiol* **41**: 223–233.

Liberman LC, Lipp OV, Spence SH, March S. 2006. Evidence for retarded extinction of aversive learning in anxious children. *Behav Res Ther* **44**: 1491–1502.

Li S, Kim JH, Richardson R. 2012. Updating memories: Changing the involvement of the prelimbic cortex in the expression of an infant fear memory. *Neuroscience* **222**: 316–325.

Liu C-H, Coleman JE, Davoudi H, Zhang K, Hussain Shuler MG. 2015. Selective Activation of a Putative Reinforcement Signal Conditions Cued Interval Timing in Primary Visual Cortex. *Curr Biol* **25**: 1551–1561.

Liu RC, Schreiner CE. 2007. Auditory Cortical Detection and Discrimination Correlates with Communicative Significance. *PLoS Biol* **5**: e173.

Li W. 2014. Learning to smell danger: acquired associative representation of threat in the olfactory cortex. *Front Behav Neurosci* **8**: 98.

Lonstein JS, Lévy F, Fleming AS. 2015. Common and divergent psychobiological mechanisms underlying maternal behaviors in non-human and human mammals. *Horm Behav* **73**: 156–185.

López-Rubalcava C, Fernández-Guasti A, Urbá-Holmgren R. 1996. Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: Effect of 5-HT1A compounds. *Dev Psychobiol* **29**: 157–169.

Lore R, Flannelly K, Farina P. 1976. Ultrasounds produced by rats accompany decreases in intraspecific fighting. *Aggress Behav* **2**: 175–181.

Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci* **10**: 434–445.

MacDonald C, Cheng R-K, Meck WH. 2012. Acquisition of "Start" and "Stop" response thresholds in peak-interval timing is differentially sensitive to protein synthesis inhibition in the dorsal and ventral striatum. *Front Integr Neurosci* **6**: 10.

MacDonald CJ, Carrow S, Place R, Eichenbaum H. 2013. Distinct Hippocampal Time Cell Sequences Represent Odor Memories in Immobilized Rats. *J Neurosci* **33**: 14607–14616.

MacDonald CJ, Lepage KQ, Eden UT, Eichenbaum H. 2011. Hippocampal "Time Cells" Bridge the Gap in Memory for Discontiguous Events. *Neuron* **71**: 737–749.

Mair RG, Gellman RL, Gesteland RC. 1982. Postnatal proliferation and maturation of olfactory bulb neurons in the rat. *Neuroscience* **7**: 3105–3116.

Mair RG, Gesteland RC. 1982. Response properties of mitral cells in the olfactory bulb of the neonatal rat. *Neuroscience* **7**: 3117–3125.

Makowska IJ, Weary DM. 2013. Assessing the emotions of laboratory rats. *Appl Anim Behav Sci* **148**: 1–12.

Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB. 1999. Combinatorial Receptor Codes for Odors. *Cell* **96**: 713–723.

Ma M. 2010. Multiple Olfactory Subsystems Convey Various Sensory Signals. In *The Neurobiology of Olfaction* (ed. A. Menini), *Frontiers in Neuroscience*, CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).

Maren S. 2001. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* **24**: 897–931.

Maren S. 2008. Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur J Neurosci* **28**: 1661–1666.

Maren S, Aharonov G, Fanselow MS. 1996a. Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: Absence of a temporal gradient. *Behav Neurosci* **110**: 718–726.

Maren S, Aharonov G, Stote DL, Fanselow MS. 1996b. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav Neurosci* **110**: 1365–1374.

Marlin BJ, Mitre M, D'amour JA, Chao MV, Froemke RC. 2015. Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature* **520**: 499–504.

Matell MS, Meck WH. 2000. Neuropsychological mechanisms of interval timing behavior. *Bioessays* **22**: 94–103.

Matell MS, Meck WH, Nicolelis MAL. 2003. Interval timing and the encoding of signal duration by ensembles of cortical and striatal neurons. *Behav Neurosci* **117**: 760–773.

McCormack K, Sanchez M m., Bardi M, Maestripieri D. 2006. Maternal care patterns and behavioral development of rhesus macaque abused infants in the first 6 months of life. *Dev Psychobiol* **48**: 537–550.

McDonald AJ. 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol* **55**: 257–332.

McEwen BS. 2003. Early life influences on life-long patterns of behavior and health. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* **9**: 149–154.

McIntosh TK, Barfield RJ. 1980. The temporal patterning of 40–60 kHz ultrasonic vocalizations and copulation in the rat (Rattus norvegicus). *Behav Neural Biol* **29**: 349–358.

Mcintosh TK, Barfield RJ, Geyer LA. 1978. Ultrasonic vocalisations facilitate sexual behaviour of female rats. *Nature* **272**: 163–164.

McLean JH, Harley CW, Darby-King A, Yuan Q. 1999. pCREB in the Neonate Rat Olfactory Bulb Is Selectively and Transiently Increased by Odor Preference–Conditioned Training. *Learn Mem* **6**: 608–618.

McLean JH, Shipley MT. 1991. Postnatal development of the noradrenergic projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *J Comp Neurol* **304**: 467–477.

Meck WH. 2006a. Frontal cortex lesions eliminate the clock speed effect of dopaminergic drugs on interval timing. *Brain Res* **1108**: 157–167.

Meck WH. 2006b. Neuroanatomical localization of an internal clock: A functional link between mesolimbic, nigrostriatal, and mesocortical dopaminergic systems. *Brain Res* **1109**: 93–107.

Medina JF, Christopher Repa J, Mauk MD, LeDoux JE. 2002. Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning. *Nat Rev Neurosci* **3**: 122–131.

Mello GBM, Soares S, Paton JJ. 2015. A Scalable Population Code for Time in the Striatum. *Curr Biol* **25**: 1113–1122.

Mennella JA, Jagnow CP, Beauchamp GK. 2001. Prenatal and Postnatal Flavor Learning by Human Infants. *Pediatrics* **107**: e88–e88.

Merchant H, Harrington DL, Meck WH. 2013. Neural Basis of the Perception and Estimation of Time. *Annu Rev Neurosci* **36**: 313–336.

Miczek KA, Thompson ML, Shuster L. 1982. Opioid-like analgesia in defeated mice. *Science* **215**: 1520–1522.

Middlemis-Brown JE, Johnson ED, Blumberg MS. 2005. Separable Brainstem and Forebrain Contributions to Ultrasonic Vocalizations in Infant Rats. *Behav Neurosci* **119**: 1111–1117.

Milad MR, Quirk GJ. 2012. Fear Extinction as a Model for Translational Neuroscience: Ten Years of Progress. *Annu Rev Psychol* **63**: 129–151.

Milad MR, Quirk GJ. 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* **420**: 70–74.

Miller RR, Barnet RC. 1993. The Role of Time in Elementary Associations. *Curr Dir Psychol Sci* **2**: 106–111.

Miserendino MJD, Sananes CB, Melia KR, Davis M. 1990. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* **345**: 716–718.

Mishkin M. 1978. Memory in monkeys severely impaired by combined but not by separate removal of amygdala and hippocampus. *Nature* **273**: 297–298.

Mizukawa K, Tseng I-M, Otsuka N. 1989. Quantitative electron microscopic analysis of postnatal development of zinc-positive nerve endings in the rat amygdala using Timm's sulphide silver technique. *Dev Brain Res* **50**: 197–203.

Moffat SD, Suh EJ, Fleming AS. 1993. Noradrenergic involvement in the consolidation of maternal experience in postpartum rats. *Physiol Behav* **53**: 805–811.

Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE. 1993. Extinction of emotional learning: Contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett* **163**: 109–113.

Moriceau S, Roth TL, Okotoghaide T, Sullivan RM. 2004. Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. *Int J Dev Neurosci* **22**: 415–422.

Moriceau S, Shionoya K, Jakubs K, Sullivan RM. 2009. Early life stress disrupts attachment learning: The role of amygdala corticosterone, locus coeruleus CRH and olfactory bulb NE. *J Neurosci* **29**: 15745–15755.

Moriceau S, Sullivan RM. 2004a. Corticosterone Influences on Mammalian Neonatal Sensitive-Period Learning. *Behav Neurosci* **118**: 274–281.

Moriceau S, Sullivan RM. 2006. Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy. *Nat Neurosci* **9**: 1004–1006.

Moriceau S, Sullivan RM. 2004b. Unique Neural Circuitry for Neonatal Olfactory Learning. *J Neurosci* **24**: 1182–1189.

Moriceau S, Wilson DA, Levine S, Sullivan RM. 2006. Dual Circuitry for Odor–Shock Conditioning during Infancy: Corticosterone Switches between Fear and Attraction via Amygdala. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **26**: 6737–6748.

Mori K, Nagao H, Yoshihara Y. 1999. The Olfactory Bulb: Coding and Processing of Odor Molecule Information. *Science* **286**: 711–715.

Morrison GL, Fontaine CJ, Harley CW, Yuan Q. 2013. A role for the anterior piriform cortex in early odor preference learning: evidence for multiple olfactory learning structures in the rat pup. *J Neurophysiol* **110**: 141–152.

Morris RG., Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**: 24.

Mortola JP, Lanthier C. 1996. The ventilatory and metabolic response to hypercapnia in newborn mammalian species. *Respir Physiol* **103**: 263–270.

Morton N, Browne KD. 1998. Theory and observation of attachment and its relation to child maltreatment: a review. *Child Abuse Negl* **22**: 1093–1104.

Motanis H, Maroun M, Barkai E. 2012. Learning-Induced Bidirectional Plasticity of Intrinsic Neuronal Excitability Reflects the Valence of the Outcome. *Cereb Cortex* **24**: 1075–1087.

Mowery TM, Kotak VC, Sanes DH. 2015. Transient Hearing Loss Within a Critical Period Causes Persistent Changes to Cellular Properties in Adult Auditory Cortex. *Cereb Cortex* **25**: 2083–2094.

Moye TB, Rudy JW. 1985. Ontogenesis of learning: VI. Learned and unlearned responses to visual stimulation in the infant hooded rat. *Dev Psychobiol* **18**: 395–409.

Moye TB, Rudy JW. 1987. Ontogenesis of trace conditioning in young rats: Dissociation of associative and memory processes. *Dev Psychobiol* **20**: 405–414.

Muller J, Brunelli S, Shair H. 2010. Chapter 6.4 - Rat infant isolation vocalizations and their modulation by social cues as a model of expression of infantile emotionality. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (ed. S.M. Brudzynski), Vol. 19 of *Handbook of Mammalian VocalizationAn Integrative Neuroscience Approach*, pp. 227–240, Elsevier.

Muller J, Corodimas KP, Fridel Z, LeDoux JE. 1997. Functional inactivation of the lateral and basal nuclei of the amygdala by muscimol infusion prevents fear conditioning to an explicit conditioned stimulus and to contextual stimuli. *Behav Neurosci* **111**: 683–691.

Nader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE. 2001. Damage to the Lateral and Central, but Not Other, Amygdaloid Nuclei Prevents the Acquisition of Auditory Fear Conditioning. *Learn Mem* **8**: 156–163.

Nair HP, Berndt JD, Barrett D, Gonzalez-Lima F. 2001. Maturation of Extinction Behavior in Infant Rats: Large-Scale Regional Interactions with Medial Prefrontal Cortex, Orbitofrontal Cortex, and Anterior Cingulate Cortex. *J Neurosci* **21**: 4400–4407.

Naito H, Inoue M, Makino J. 2000. Ultrasonic Isolation Calls in Genetically High- and Low-Emotional Rat Pups. *Exp Anim* **49**: 289–294.

Nakamura S, Kimura F, Sakaguchi T. 1987. Postnatal development of electrical activity in the locus ceruleus. *J Neurophysiol* **58**: 510–524.

Nakamura S, Sakaguchi T. 1990. Development and plasticity of the locus coeruleus: A review of recent physiological and pharmacological experimentation. *Prog Neurobiol* **34**: 505–526.

Nelson EE, Alberts JR. 2002. Gastric saline infusion reduces ultrasonic vocalizations and brown fat activity in suckling rat pups. *Dev Psychobiol* **40**: 160–167.

Noirot E. 1968. Ultrasounds in young rodents. II. Changes with age in albino rats. *Anim Behav* **16**: 129–134.

Nsegbe E, Vardon G, Perruchet P, Gallego J. 1997. Classic conditioning of the ventilatory responses in rats. *J Appl Physiol* **83**: 1174–1183.

Nsegbe E, Villaret E, Renolleau S, Vardon G, Gaultier C, Gallego J. 1999. Behavioural correlates of conditioned ventilatory responses to hypoxia in rats. *Behav Brain Res* **106**: 29–37.

Nunez AA, Pomerantz SM, Bean NJ, Youngstrom TG. 1985. Effects of laryngeal denervation on ultrasound production and male sexual behavior in rodents. *Physiol Behav* **34**: 901–905.

Ohyama T, Nores WL, Medina JF, Riusech FA, Mauk MD. 2006. Learning-induced plasticity in deep cerebellar nucleus. *J Neurosci* **26**: 12656–12663.

Okon EE. 1970. The effect of environmental temperature on the production of ultrasounds by isolated non-handled albino mouse pups. *J Zool* **162**: 71–83.

Okon EE. 1971. The temperature relations of vocalization in infant Golden hamsters and Wistar rats. *J Zool* **164**: 227–237.

Oswalt GL, Meier GW. 1975. Olfactory, thermal, and tactual influences on infantile ultrasonic vocalization in rats. *Dev Psychobiol* **8**: 129–135.

Palouzier-Paulignan B, Lacroix M-C, Aimé P, Baly C, Caillol M, Congar P, Julliard AK, Tucker K, Fadool DA. 2012. Olfaction Under Metabolic Influences. *Chem Senses* **37**: 769–797.

Panksepp J, Gordon N, Burgdorf J. 2002. Empathy and the action-perception resonances of basic socio-emotional systems of the brain. *Behav Brain Sci* **25**: 43–44.

Parker KL, Chen K-H, Kingyon JR, Cavanagh JF, Narayanan NS. 2014. D1-Dependent 4 Hz Oscillations and Ramping Activity in Rodent Medial Frontal Cortex during Interval Timing. *J Neurosci* **34**: 16774–16783.

Parker KL, Ruggiero RN, Narayanan NS. 2015. Infusion of D1 Dopamine Receptor Agonist into Medial Frontal Cortex Disrupts Neural Correlates of Interval Timing. *Front Behav Neurosci* **9**. http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnbeh.2015.00294/abstract (Accessed March 30, 2016).

Park IM, Bobkov YV, Ache BW, Príncipe JC. 2014. Intermittency Coding in the Primary Olfactory System: A Neural Substrate for Olfactory Scene Analysis. *J Neurosci* **34**: 941–952.

Parsana AJ, Li N, Brown TH. 2012a. Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. *Behav Brain Res* **226**: 77–86.

Parsana AJ, Moran EE, Brown TH. 2012b. Rats learn to freeze to 22-kHz ultrasonic vocalizations through autoconditioning. *Behav Brain Res* **232**: 395–399.

Pastalkova E, Itskov V, Amarasingham A, Buzsáki G. 2008. Internally Generated Cell Assembly Sequences in the Rat Hippocampus. *Science* **321**: 1322–1327.

Paton JFR, Richter DW. 1995. Maturational changes in the respiratory rhythm generator of the mouse. *Pflüg Arch* **430**: 115–124.

Pattwell SS, Duhoux S, Hartley CA, Johnson DC, Jing D, Elliott MD, Ruberry EJ, Powers A, Mehta N, Yang RR, et al. 2012. Altered fear learning across development in both mouse and human. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 16318–16323.

Pattwell SS, Mouly A-M, Sullivan RM, Lee FS. 2013. Developmental compoents of fear and anxiety in animal models. In *Neurobiology of Mental Illness* (eds. D.S. Charney, J.D. Buxbaum, P. Sklar, and E.J. Nestler), pp. 593–605, Oxford University Press.

Pavlov IP. 1927. *Conditioned reflexes*. Oxford University press: Humphrey Milford, London.

Pedersen PE, Blass EM. 1982. Prenatal and postnatal determinants of the 1st suckling episode in albino rats. *Dev Psychobiol* **15**: 349–355.

Pedersen PE, Williams CL, Blass EM. 1982. Activation and odor conditioning of suckling behavior in 3-day-old albino rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **8**: 329–341.

Pereira A, Ribeiro S, Wiest M, Moore LC, Pantoja J, Lin S-C, Nicolelis MAL. 2007. Processing of tactile information by the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 18286–18291.

Perez-Sepulveda JA, Flagel SB, Garcia-Fuster MJ, Slusky RJ, Aldridge JW, Watson S, Akil H. 2013. Differential impact of a complex environment on positive affect in an animal model of individual differences in emotionality. *Neuroscience* **248**: 436–447.

Perry BD. 2007. *Maltreated children: Experience, brain development and the next generation*. WW Norton & Company Incorporated.

Perry R, Sullivan RM. 2014. Neurobiology of Attachment to an Abusive Caregiver: Short-Term Benefits and Long-Term Costs. *Dev Psychobiol* **56**: 1626–1634.

Pessoa L, Adolphs R. 2010. Emotion processing and the amygdala: from a “low road” to “many roads” of evaluating biological significance. *Nat Rev Neurosci* **11**: 773–783.

Phillips RG, LeDoux JE. 1992. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **106**: 274–285.

Pisano MV, Ferreras S, Krapacher FA, Paglini G, Arias C. 2012. Re-examining the ontogeny of the context preexposure facilitation effect in the rat through multiple dependent variables. *Behav Brain Res* **233**: 176–190.

Pitz GF, Ross RB. 1961. Imprinting as a function of arousal. *J Comp Physiol Psychol* **54**: 602–604.

Quirarte GL, Roozendaal B, McGaugh JL. 1997. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 14048–14053.

Quirk GJ, Likhtik E, Pelletier JG, Paré D. 2003. Stimulation of Medial Prefrontal Cortex Decreases the Responsiveness of Central Amygdala Output Neurons. *J Neurosci* **23**: 8800–8807.

Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K. 2000. The Role of Ventromedial Prefrontal Cortex in the Recovery of Extinguished Fear. *J Neurosci* **20**: 6225–6231.

Raineki C, Cortés MR, Belnoue L, Sullivan RM. 2012. Effects of early life abuse differ across development: Infant social behavior deficits are followed by adolescent depressive-like behaviors mediated by the amygdala. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **32**: 7758–7765.

Raineki C, Holman PJ, Debiec J, Bugg M, Beasley A, Sullivan RM. 2010a. Functional emergence of the hippocampus in context fear learning in infant rats. *Hippocampus* **20**: 1037–1046.

Raineki C, Moriceau S, Sullivan RM. 2010b. Developing a Neurobehavioral Animal Model of Infant Attachment to an Abusive Caregiver. *Biol Psychiatry* **67**: 1137–1145.

Raineki C, Shionoya K, Sander K, Sullivan RM. 2009. Ontogeny of odor-LiCl vs. odor-shock learning: Similar behaviors but divergent ages of functional amygdala emergence. *Learn Mem* **16**: 114–121.

Rajecki DW, Lamb ME, Obmascher P. 1978. Toward a general theory of infantile attachment: a comparative review of aspects of the social bond. *Behav Brain Sci* **1**: 417–436.

Rangel S, Leon M. 1995. Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. *Dev Brain Res* **85**: 187–191.

Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB. 1994. A molecular dissection of spatial patterning in the olfactory system. *Curr Opin Neurobiol* **4**: 588–596.

Revillo DA, Paglini MG, Arias C. 2014. Spontaneous recovery from extinction in the infant rat. *Behav Brain Res* **274**: 149–157.

Richardson R, Hunt PS. 2009. Ontogeny of Fear Conditioning. In *Oxford Handbook of Developmental Behavioral Neuroscience* (eds. M.S. Blumberg, J.H. Freeman, and S.R. Robinson), Oxford University Press.

Riede T. 2013. Stereotypic Laryngeal and Respiratory Motor Patterns Generate Different Call Types in Rat Ultrasound Vocalization. *J Exp Zool Part Ecol Genet Physiol* **319**: 213–224.

Riede T. 2011. Subglottal pressure, tracheal airflow, and intrinsic laryngeal muscle activity during rat ultrasound vocalization. *J Neurophysiol* **106**: 2580–2592.

Riede T, Zhao Y, LeDoux MS. 2015. Vocal development in dystonic rats. *Physiol Rep* **3**: e12350.

Rincón-Cortés M, Barr GA, Mouly AM, Shionoya K, Nuñez BS, Sullivan RM. 2015. Enduring good memories of infant trauma: Rescue of adult neurobehavioral deficits via amygdala serotonin and corticosterone interaction. *Proc Natl Acad Sci* **112**: 881–886.

Rincón-Cortés M, Sullivan RM. 2014. Early Life Trauma and Attachment: Immediate and Enduring Effects on Neurobehavioral and Stress Axis Development. *Front Endocrinol* **5**: 33.

Roberts LH. 1972. Correlation of respiration and ultrasound production in rodents and bats. *J Zool* **168**: 439–449.

Roberts LH. 1975a. Evidence for the laryngeal source of ultrasonic and audible cries of rodents. *J Zool* **175**: 243–257.

Roberts LH. 1975b. The rodent ultrasound production mechanism. *Ultrasonics* **13**: 83–88.

Roozendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh JL. 1999. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 11642–11647.

Rosenkranz JA, Grace AA. 2002. Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. *Nature* **417**: 282–287.

Rosselli-Austin L, Altman J. 1979. The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J Dev Physiol* **1**: 295–313.

Rothschild G, Cohen L, Mizrahi A, Nelken I. 2013. Elevated Correlations in Neuronal Ensembles of Mouse Auditory Cortex Following Parturition. *J Neurosci* **33**: 12851–12861.

Roth TL, Moriceau S, Sullivan RM. 2006. Opioid modulation of Fos protein expression and olfactory circuitry plays a pivotal role in what neonates remember. *Learn Mem* **13**: 590–598.

Roth TL, Raineki C, Salstein L, Perry R, Sullivan-Wilson TA, Sloan A, Lalji B, Hammock E, Wilson DA, Levitt P, et al. 2013. Neurobiology of secure infant attachment and attachment despite adversity: a mouse model. *Genes Brain Behav* **12**: 673–680.

Roth TL, Sullivan RM. 2005. Memory of early maltreatment: Neonatal behavioral and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. *Biol Psychiatry* **57**: 823–831.

Rudy J, Cheatle M. 1977. Odor-aversion learning in neonatal rats. *Science* **198**: 845–846.

Rudy JW. 1993. Contextual conditioning and auditory cue conditioning dissociate during development. *Behav Neurosci* **107**: 887–891.

Rudy JW. 1994. Ontogeny of context-specific latent inhibition of conditioned fear: Implications for configural associations theory and hippocampal formation development. *Dev Psychobiol* **27**: 367–379.

Rudy JW. 2014. *The neurobiology of learning and memory*. Sinauer Associates, Sunderland (Mass.), Etats-Unis d'Amérique.

Rudy JW, Morledge P. 1994. Ontogeny of contextual fear conditioning in rats: Implications for consolidation, infantile amnesia, and hippocampal system function. *Behav Neurosci* **108**: 227–234.

Rudy JW, Stadler-Morris S, Albert P. 1987. Ontogeny of spatial navigation behaviors in the rat: Dissociation of "proximal"- and "distal"-cue-based behaviors. *Behav Neurosci* **101**: 62–73.

Ryan SJ, Ehrlich DE, Rainnie DG. 2014. Morphology and dendritic maturation of developing principal neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Struct Funct* **221**: 839–854.

Sacchetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Tassoni G, Bucherelli C. 1999. Auditory Thalamus, Dorsal Hippocampus, Basolateral Amygdala, and Perirhinal Cortex Role in the Consolidation of Conditioned Freezing to Context and to Acoustic Conditioned Stimulus in the Rat. *J Neurosci* **19**: 9570–9578.

Sacco T, Sacchetti B. 2010. Role of Secondary Sensory Cortices in Emotional Memory Storage and Retrieval in Rats. *Science* **329**: 649–656.

Sadananda M, Wöhr M, Schwarting RKW. 2008. Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neurosci Lett* **435**: 17–23.

Saignavongs M, Baret B. 2014. Neurocontes : histoires (de cerveaux) extraordinaires.

Saive A-L. 2015. Les odeurs, une passerelle vers les souvenirs: caractérisation des processus cognitifs et des fondements neuronaux de la mémoire épisodique olfactive. Université Claude Bernard-Lyon I https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01223747/.

Salas M, Guzman-Flores C, Schapiro S. 1969. An ontogenetic study of olfactory bulb electrical activity in the rat. *Physiol Behav* **4**: 699–703.

Sales GD. 1991. The effect of 22 kHz calls and artificial 38 kHz signals on activity in rats. *Behav Processes* **24**: 83–93.

Sanchez MM. 2006. The impact of early adverse care on HPA axis development: Nonhuman primate models. *Horm Behav* **50**: 623–631.

Sanders I, Weisz DJ, Yang BY, Fung K, Amirali A. 2001. The mechanism of ultrasonic vocalisation in the rat. http://www.sfn.org/Annual-Meeting/Past-and-Future-Annual-Meetings/Abstract-Archive/Abstract-Archive-Detail?AbsYear=2001&AbsID=1389.

Sanders MJ, Wiltgen BJ, Fanselow MS. 2003. The place of the hippocampus in fear conditioning. *Eur J Pharmacol* **463**: 217–223.

Sara SJ. 2009. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* **10**: 211–223.

Sara SJ, Dyon-Laurent C, Hervé A. 1995. Novelty seeking behavior in the rat is dependent upon the integrity of the noradrenergic system. *Cogn Brain Res* **2**: 181–187.

Schaal B, Marlier L, Soussignan R. 1998. Olfactory function in the human fetus: evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. *Behav Neurosci* **112**: 1438–1449.

Schafe GE, LeDoux JE. 2000. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* **20**: RC96.

Schmid A, Koch M, Schnitzler HU. 1995. Conditioned Pleasure Attenuates the Startle Response in Rats. *Neurobiol Learn Mem* **64**: 1–3.

Schouten WGP. 1988. Development of ultrasonic vocalization in the rat (Rattus norvegicus). *Proc Int Congr Appl Ethol Farm Anim* 384–391.

Schwarting RKW, Wöhr M. 2012. On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. *Braz J Med Biol Res* **45**: 337–348.

Schwob JE, Haberly LB, Price JL. 1984. The development of physiological responses of the piriform cortex in rats to stimulation of the lateral olfactory tract. *J Comp Neurol* **223**: 223–237.

Scoville WB, Milner B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**: 11–21.

Seay B, Alexander BK, Harlow HF. 1964. Maternal behavior of socially deprived Rhesus monkeys. *J Abnorm Soc Psychol* **69**: 345–354.

Seffer D, Schwarting RKW, Wöhr M. 2014. Pro-social ultrasonic communication in rats: Insights from playback studies. *J Neurosci Methods* **234**: 73–81.

Selden NR, Robbins TW, Everitt BJ. 1990. Enhanced behavioral conditioning to context and impaired behavioral and neuroendocrine responses to conditioned stimuli following ceruleocortical noradrenergic lesions: support for an attentional hypothesis of central noradrenergic function. *J Neurosci* **10**: 531–539.

Sevelinges Y. 2006. L'odeur de la peur : Neurobiologie du conditionnement de peur à l'odeur chez le rat adulte et conséquences à long-terme des expériences néonatales. phdthesis, Université Claude Bernard - Lyon I https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00944142/document.

Sevelinges Y, Gervais R, Messaoudi B, Granjon L, Mouly A-M. 2004. Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learn Mem* **11**: 761–769.

Sevelinges Y, Moriceau S, Holman P, Miner C, Muzny K, Gervais R, Mouly A-M, Sullivan RM. 2007. Enduring Effects of Infant Memories: Infant Odor-Shock Conditioning Attenuates Amygdala Activity and Adult Fear Conditioning. *Biol Psychiatry* **62**: 1070–1079.

Sevelinges Y, Mouly A-M, Raineki C, Moriceau S, Forest C, Sullivan RM. 2011. Adult depression-like behavior, amygdala and olfactory cortex functions are restored by odor previously paired with shock during infant's sensitive period attachment learning. *Dev Cogn Neurosci* **1**: 77–87.

Sevelinges Y, Sullivan RM, Messaoudi B, Mouly A-M. 2008. Neonatal odor-shock conditioning alters the neural network involved in odor fear learning at adulthood. *Learn Mem* **15**: 649–656.

Sewell GD. 1967. Ultrasound in Adult Rodents. *Nature* **215**: 512–512.

Shair HN, Smith JA, Welch MG. 2012. Cutting the vagus nerve below the diaphragm prevents maternal potentiation of infant rat vocalization. *Dev Psychobiol* **54**: 70–76.

Shakhawat AM, Harley CW, Yuan Q. 2012. Olfactory bulb α2-adrenoceptor activation promotes rat pup odor-preference learning via a cAMP-independent mechanism. *Learn Mem* **19**: 499–502.

Shionoya K, Hegoburu C, Brown BL, Sullivan RM, Doyère V, Mouly A-M. 2013. It's time to fear! Interval timing in odor fear conditioning in rats. *Front Behav Neurosci* **7**: 128.

Shipley MT, Ennis M. 1996. Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* **30**: 123–176.

Shipley MT, Halloran FJ, de la Torre J. 1985. Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* **329**: 294–299.

Simola N. 2015. Rat Ultrasonic Vocalizations and Behavioral Neuropharmacology: From the Screening of Drugs to the Study of Disease. *Curr Neuropharmacol* **13**: 164–179.

Singh PJ, Tobach E. 1975. Olfactory bulbectomy and nursing behavior in rat pups (Wistar DAB). *Dev Psychobiol* **8**: 151–164.

Sirotin YB, Costa ME, Laplagne DA. 2014. Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior. *Front Behav Neurosci* **8**. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4235378/ (Accessed August 7, 2015).

Small WS. 1899. Notes on the Psychic Development of the Young White Rat. *Am J Psychol* **11**: 80–100.

Smotherman WP. 1982. Odor aversion learning by the rat fetus. *Physiol Behav* **29**: 769–771.

Smotherman WP, Bell RW, Starzec J, Elias J, Zachman TA. 1974. Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice. *Behav Biol* **12**: 55–66.

Snow AE, Tucker SM, Dewey WL. 1982. The role of neurotransmitters in stress-induced antinociception (SIA). *Pharmacol Biochem Behav* **16**: 47–50.

Spear LP, Karl Enters E, Aswad MA, Louzan M. 1985. Drug and environmentally induced manipulations of the opiate and serotonergic systems alter nociception in neonatal rat pups. *Behav Neural Biol* **44**: 1–22.

Squire LR. 2004. Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiol Learn Mem* **82**: 171–177.

Stehouwer DJ, Campbell BA. 1978. Habituation of the forelimb-withdrawal response in neonatal rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **4**: 104–119.

Stevenson I, Ripley HS. 1952. Variations in respiration and in respiratory symptoms during changes in emotion. *Psychosom Med* **14**: 476–490.

Sullivan RM, Landers M, Yeaman B, Wilson DA. 2000a. Neurophysiology: Good memories of bad events in infancy. *Nature* **407**: 38–39.

Sullivan RM, Leon M. 1986. Early olfactory learning induces an enhanced olfactory bulb response in young rats. *Dev Brain Res* **27**: 278–282.

Sullivan RM, McGaugh JL, Leon M. 1991. Norepinephrine-induced plasticity and one-trial olfactory learning in neonatal rats. *Dev Brain Res* **60**: 219–228.

Sullivan RM, Stackenwalt G, Nasr F, Lemon C, Wilson DA. 2000b. Association of an odor with an activation of olfactory bulb noradrenergic β-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behav Neurosci* **114**: 957.

Sullivan RM, Wilson DA. 1995. Dissociation of behavioral and neural correlates of early associative learning. *Dev Psychobiol* **28**: 213–219.

Sullivan RM, Wilson DA. 1991. Neural correlates of conditioned odor avoidance in infant rats. *Behav Neurosci* **105**: 307–312.

Sullivan RM, Wilson DA, Lemon C, Gerhardt GA. 1994. Bilateral 6-OHDA lesions of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. *Brain Res* **643**: 306–309.

Sullivan RM, Wilson DA, Leon M. 1989. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *J Neurosci* **9**: 3998–4006.

Sullivan RM, Zyzak DR, Skierkowski P, Wilson DA. 1992. The role of olfactory bulb norepinephrine in early olfactory learning. *Dev Brain Res* **70**: 279–282.

Suomi SJ. 1978. Maternal Behavior by Socially Incompetent Monkeys: Neglect and Abuse of Offspring. *J Pediatr Psychol* **3**: 28–34.

Suzuki N, Bekkers JM. 2007. Inhibitory interneurons in the piriform cortex. In *Proceedings of the Australien Phisiological Society*, Vol. 38 of, pp. 9–14.

Swanson LW, Petrovich GD. 1998. What is the amygdala? *Trends Neurosci* **21**: 323–331.

Takahashi LK. 1992. Developmental expression of defensive responses during exposure to conspecific adults in preweanling rats (Rattus norvegicus). *J Comp Psychol* **106**: 69–77.

Takahashi LK. 1994a. Organizing action of corticosterone on the development of behavioral inhibition in the preweanling rat. *Dev Brain Res* **81**: 121–127.

Takahashi LK. 1994b. Stimulus control of behavioral inhibition in the preweanling rat. *Physiol Behav* **55**: 717–721.

Takahashi LK, Turner JG, Kalin NH. 1991. Development of stress-induced responses in preweanling rats. *Dev Psychobiol* **24**: 341–360.

Takahashi N, Kashino M, Hironaka N. 2010. Structure of Rat Ultrasonic Vocalizations and Its Relevance to Behavior. *PLoS ONE* **5**: e14115.

Tallot L. 2015. Traitement de l'information temporelle dans le réseau amygdalo-préfronto-dorsostriatal chez le rat. Université Paris-Saclay.

Tallot L, Capela D, Brown BL, Doyère V. 2016. Individual trial analysis evidences clock and non-clock based conditioned suppression behaviors in rats. *Behav Processes* 97–107.

Tam SKE, Jennings DJ, Bonardi C. 2015. Effects of dorsal hippocampal damage on conditioning and conditioned-response timing: A pooled analysis: Hippocampus and Response Timing. *Hippocampus* **25**: 444–459.

Teicher MH, Blass EM. 1977. First suckling response of the newborn albino rat: the roles of olfaction and amniotic fluid. *Science* **198**: 635–636.

Tepper JM, Sharpe NA, Koós TZ, Trent F. 1998. Postnatal development of the rat neostriatum: electrophysiological, light-and electron-microscopic studies. *Dev Neurosci* **20**: 125–145.

Terkel J, Damassa DA, Sawyer CH. 1979. Ultrasonic cries from infant rats stimulate prolactin release in lactating mothers. *Horm Behav* **12**: 95–102.

Terzian H, Ore GD. 1955. Syndrome of Klüver and Bucy, reproduced in man by bilateral removal of the temporal lobes. *Neurology* **5**: 374–380.

Thomas DA, Talalas L, Barfield RJ. 1981. Effect of devocalization of the male on mating behavior in rats. *J Comp Physiol Psychol* **95**: 630–637.

Thompson JV, Sullivan RM, Wilson DA. 2008. Developmental Emergence of Fear Learning Corresponds with Changes in Amygdala Synaptic Plasticity. *Brain Res* **1200**: 58–65.

Thorndike EL. 1898. Animal intelligence: An experimental study of the associative processes in animals. *Psychol Rev Monogr Suppl* **2**: i.

Van Der Poel AM, Miczek KA. 1991. Long Ultrasonic Calls in Male Rats Following Mating, Defeat and Aversive Stimulation: Frequency Modulation and Bout Structure. *Behaviour* **119**: 127–142.

van Eden CG, Uylings HBM. 1985. Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. *J Comp Neurol* **241**: 253–267.

Verwer RWH, Van Vulpen EHS, Van Uum JFM. 1996. Postnatal development of amygdaloid projections to the prefrontal cortex in the rat studied with retrograde and anterograde tracers. *J Comp Neurol* **376**: 75–96.

Veyrac A, Allerborn M, Gros A, Michon F, Raguet L, Kenney J, Godinot F, Thevenet M, Garcia S, Messaoudi B, et al. 2015. Memory of Occasional Events in Rats: Individual Episodic Memory Profiles, Flexibility, and Neural Substrate. *J Neurosci* **35**: 7575–7586.

Villers-Sidani E de, Chang EF, Bao S, Merzenich MM. 2007. Critical Period Window for Spectral Tuning Defined in the Primary Auditory Cortex (A1) in the Rat. *J Neurosci* **27**: 180–189.

Vivian JA, Miczek KA. 1991. Ultrasounds during morphine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **104**: 187–193.

Walker DL, Paschall GY, Davis M. 2005. Glutamate receptor antagonist infusions into the basolateral and medial amygdala reveal differential contributions to olfactory vs. context fear conditioning and expression. *Learn Mem* **12**: 120–129.

Walker P, Carrive P. 2003. Role of ventrolateral periaqueductal gray neurons in the behavioral and cardiovascular responses to contextual conditioned fear and poststress recovery. *Neuroscience* **116**: 897–912.

Watson JB, Rayner R. 1920. Conditioned emotional reactions. *J Exp Psychol* **3**: 1.

Weber M, Paxinos G, Richardson R. 2000. Conditioned changes in ultrasonic vocalizations to an aversive olfactory stimulus are lateralized in 6-day-old rats. *Dev Psychobiol* **37**: 121–128.

Weber M, Richardson R. 2004. Pretraining Inactivation of the Caudal Pontine Reticular Nucleus Impairs the Acquisition of Conditioned Fear-Potentiated Startle to an Odor, but Not a Light. *Behav Neurosci* **118**: 965–974.

Weldon DA, Travis ML, Kennedy DA. 1991. Posttraining D1 receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats. *Behav Neurosci* **105**: 450–458.

Welker WI. 1964. Analysis of sniffing of the albino rat. *Behav Leiden* **22**: 223–244.

Wendler E, Gaspar JCC, Ferreira TL, Barbiero JK, Andreatini R, Vital MABF, Blaha CD, Winn P, Da Cunha C. 2014. The roles of the nucleus accumbens core, dorsomedial striatum, and dorsolateral striatum in learning: Performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. *Neurobiol Learn Mem* **109**: 27–36.

Westneat MW, Hal WG. 1992. Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: An electromyographic analysis of suckling and chewing. *Behav Neurosci* **106**: 539–554.

Wetzel DM, Kelley DB, Campbell BA. 1980. Central control of ultrasonic vocalizations in neonatal rats: I. Brain stem motor nuclei. *J Comp Physiol Psychol* **94**: 596–605.

White NR, Barfield RJ. 1990. Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (Rattus norvegicus). *J Comp Psychol* **104**: 140–146.

White NR, Gonzales RN, Barfield RJ. 1993. Do vocalizations of the male rat elicit calling from the female? *Behav Neural Biol* **59**: 76–78.

Wiedenmayer CP. 2009. Plasticity of defensive behavior and fear in early development. *Neurosci Biobehav Rev* **33**: 432–441.

Wiedenmayer CP, Barr GA. 1998. Ontogeny of Defensive Behavior and Analgesia in Rat Pups Exposed to an Adult Male Rat. *Physiol Behav* **63**: 261–269.

Wiedenmayer CP, Goodwin GA, Barr GA. 2000. The effect of periaqueductal gray lesions on responses to age-specific threats in infant rats. *Dev Brain Res* **120**: 191–198.

Wiedenmayer CP, Magarinos AM, Mcewen BS, Barr GA. 2003. Mother Lowers Glucocorticoid Levels of Preweaning Rats After Acute Threat. *Ann N Y Acad Sci* **1008**: 304–307.

Wigger A, Loerscher P, Weissenbacher P, Holsboer F, Landgraf R. 2001. Cross-Fostering and Cross-Breeding of HAB and LAB Rats: A Genetic Rat Model of Anxiety. *Behav Genet* **31**: 371–382.

Willuhn I, Tose A, Wanat MJ, Hart AS, Hollon NG, Phillips PEM, Schwarting RKW, Wohr M. 2014. Phasic Dopamine Release in the Nucleus Accumbens in Response to Pro-Social 50 kHz Ultrasonic Vocalizations in Rats. *J Neurosci* **34**: 10616–10623.

Wilson DA, Leon M. 1988. Noradrenergic modulation of olfactory bulb excitability in the postnatal rat. *Dev Brain Res* **42**: 69–75.

Wilson DA, Sullivan RM. 1992. Blockade of mitral/tufted cell habituation to odors by association with reward: a preliminary note. *Brain Res* **594**: 143–145.

Wilson DA, Sullivan RM. 2011. Cortical Processing of Odor Objects. *Neuron* **72**: 506–519.

Wilson DA, Sullivan RM. 1990. Olfactory associative conditioning in infant rats with brain stimulation as reward. I. Neurobehavioral consequences. *Dev Brain Res* **53**: 215–221.

Wilson DA, Sullivan RM, Leon M. 1985. Odor familiarity alters mitral cell response in the olfactory bulb of neonatal rats. *Dev Brain Res* **22**: 314–317.

Wilson DA, Sullivan RM, Leon M. 1987. Single-unit analysis of postnatal olfactory learning: modified olfactory bulb output response patterns to learned attractive odors. *J Neurosci* **7**: 3154–3162.

Winocur G, Rawlins JN, Gray JA. 1987. The hippocampus and conditioning to contextual cues. *Behav Neurosci* **101**: 617.

Wöhr M, Borta A, Schwarting RKW. 2005. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: A dose–response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem* **84**: 228–240.

Wöhr M, Houx B, Schwarting RKW, Spruijt B. 2008. Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. *Physiol Behav* **93**: 766–776.

Wöhr M, Schwarting RKW. 2008. Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. *Behav Neurosci* **122**: 310–330.

Wöhr M, Schwarting RKW. 2007. Ultrasonic Communication in Rats: Can Playback of 50-kHz Calls Induce Approach Behavior? *PLoS ONE* **2**: e1365.

Woo CC, Coopersmith R, Leon M. 1987. Localized changes in olfactory bulb morphology associated with early olfactory learning. *J Comp Neurol* **263**: 113–125.

Wright JM, Dobosiewicz MRS, Clarke PBS. 2012. α- and β-Adrenergic Receptors Differentially Modulate the Emission of Spontaneous and Amphetamine-Induced 50-kHz Ultrasonic Vocalizations in Adult Rats. *Neuropsychopharmacology* **37**: 808–821.

Wright JM, Gourdon JC, Clarke PBS. 2010. Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology (Berl)* **211**: 1–13.

Yanovsky Y, Ciatipis M, Draguhn A, Tort ABL, Brankačk J. 2014. Slow Oscillations in the Mouse Hippocampus Entrained by Nasal Respiration. *J Neurosci* **34**: 5949–5964.

Yin HH, Knowlton BJ. 2006. The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat Rev Neurosci* **7**: 464–476.

Yuan Q, Harley CW, Bruce JC, Darby-King A, McLean JH. 2000. Isoproterenol Increases CREB Phosphorylation and Olfactory Nerve–Evoked Potentials in Normal and 5-HT-Depleted Olfactory Bulbs in Rat Pups Only at Doses That Produce Odor Preference Learning. *Learn Mem* **7**: 413–421.

Yuan Q, Harley CW, McLean JH. 2003. Mitral Cell β1 and 5-HT2A Receptor Colocalization and cAMP Coregulation: A New Model of Norepinephrine-Induced Learning in the Olfactory Bulb. *Learn Mem* **10**: 5–15.

Yuan Q, Harley CW, McLean JH, Knöpfel T. 2002. Optical Imaging of Odor Preference Memory in the Rat Olfactory Bulb. *J Neurophysiol* **87**: 3156–3159.

Zheng CM, Ito S, Minami S, Horikawa J, Murata K. 1992. Frequency thresholds of rat cochlear nerve fibers. *Jpn J Physiol* **42**: 459–72.

Zhou W, Crystal JD. 2010. Validation of a rodent model of episodic memory. *Anim Cogn* **14**: 325–340.

Larynx. *Wikipedia Free Encycl*. https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Larynx&oldid=694883058 (Accessed January 7, 2016).

Publications et conférences scientifiques

I. Publications en lien avec le travail de thèse

Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers JL, Londen E, Rousselot J, Thevenet M, Sullivan-Wilson T, Doyère V, Sullivan RM, Mouly A-M (2014). Infant rats can learn time intervals before the maturation of the striatum: evidence from odor fear conditioning. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **8**, 176

Boulanger Bertolus J, Mouly A-M, Sullivan R.M. Ecologically Relevant Neurobehavioral Assessment of the Development of Threat Learning. *En revue à Learning & Memory*

Boulanger Bertolus J, Rincon-Cortes M, Sullivan R.M., Mouly A-M. Infant rat ultrasonic vocalizations: two kinds of cries for two different functions? *En préparation*

II. Publications en dehors du travail de thèse

Boulanger Bertolus J, Knippenberg J, Verschueren A, Le Blanc P, Brown BL, Mouly A-M, and Doyère V (2015). Timing behavior in auditory fear conditioning: Stimulus property matters. *International Journal of Comparative Psychology*, **28**.

Boulanger Bertolus J, Nemeth G, Makowska JI, Weary DM. Rat aversion to sevoflurane versus isoflurane (2015). *Applied Animal Behavioural Science* **164**: 73-80

III. Présentations orales

Boulanger Bertolus J. Ontogeny of the emotional response to an aversive event in rats. *Wesson lab*, November 2015, Case Western University Reserve, Cleveland, USA

Boulanger Bertolus J. Ontogeny of the emotional response to an aversive event in rats. *Mason lab*, November 2015, University of Chicago, Chicago, USA

Boulanger Bertolus J. Ontogeny of the emotional response to an aversive event in rats. *Molecular and behavioral research institute*, October 2015, University of Michigan, Ann Arbor, USA

Boulanger Bertolus J, Rincon-Cortes M, Sullivan RM, Mouly A-M. Ontogeny of the ultrasonic vocalization response to an aversive event in rats. *Society for Neuroscience*, October 2015, Chicago, USA

Boulanger Bertolus J, Rincon-Cortes M, Sullivan RM, Mouly A-M. Ontogeny of the ultrasonic vocalization response to an aversive event in rats. *International Society for Developmental Psychology*, July 2015, San Sebastian, Spain

Boulanger Bertolus J. Determining the neuronal basis of interval timing through odor fear conditioning in rats. *Doctoral School Neuroscience and Cognition Annual Meeting*, April 2015, Lyon, France

Boulanger Bertolus J. Infant rats can learn time. *Research Group NeuroMem*, May 2014, Grasse, France

Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers JL, Londen E, Rousselot J, Szyba K, Thévenet M, Sullivan-Wilson TA, Doyère V, Sullivan RM, Mouly A-M. Ontogenesis of timing behavior in odor fear conditioning. *Partner University Fund*, Nov 2013, New-York, USA

Boulanger Bertolus J, Knippenberg J, Verschueren A, Le Blanc P, Brown BL, Mouly A-M, Doyère V. Timing behavior in auditory conditioning: Tone frequency matters. *Partner University Fund*, Fev 2013, Washington DC, USA

IV. Présentations affichées

Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers J, Londen E, Rousselot J, Szyba K., Thévenet M, Sullivan-Wilson T, Doyere V, Sullivan RM and Mouly A-M. Infant rats can learn time intervals before the maturation of the striatum: evidence from odor fear conditioning. *Research Group NeuroMem*, May 2014, Grasse, France

Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers J, Londen E, Rousselot J, Thévenet M, Doyere V, Sullivan RM and Mouly A-M. At what age are rat pups able to encode time? An investigation using odor fear conditioning. *European Brain and Behavior Society*, Sept 2013, Munich, Germany

Boulanger Bertolus J, Ahers J, Londen E, Hegoburu C, Rousselot J, Doyere V, Sullivan RM and Mouly A-M. At what age are rat pups able to encode time? An investigation using odor fear conditioning. *Société des Neurosciences Françaises*, May 2013, Lyon, France

Boulanger Bertolus J, Shionoya K, Ahers J, Londen E, Hegoburu C, Sullivan-Wilson T, Rousselot J, Brown BL, Doyere V, Sullivan RM and Mouly A-M. Ontogenesis of time interval encoding in odor fear conditioning. *Eastern Psychology Association*, March 2013, New-York, USA

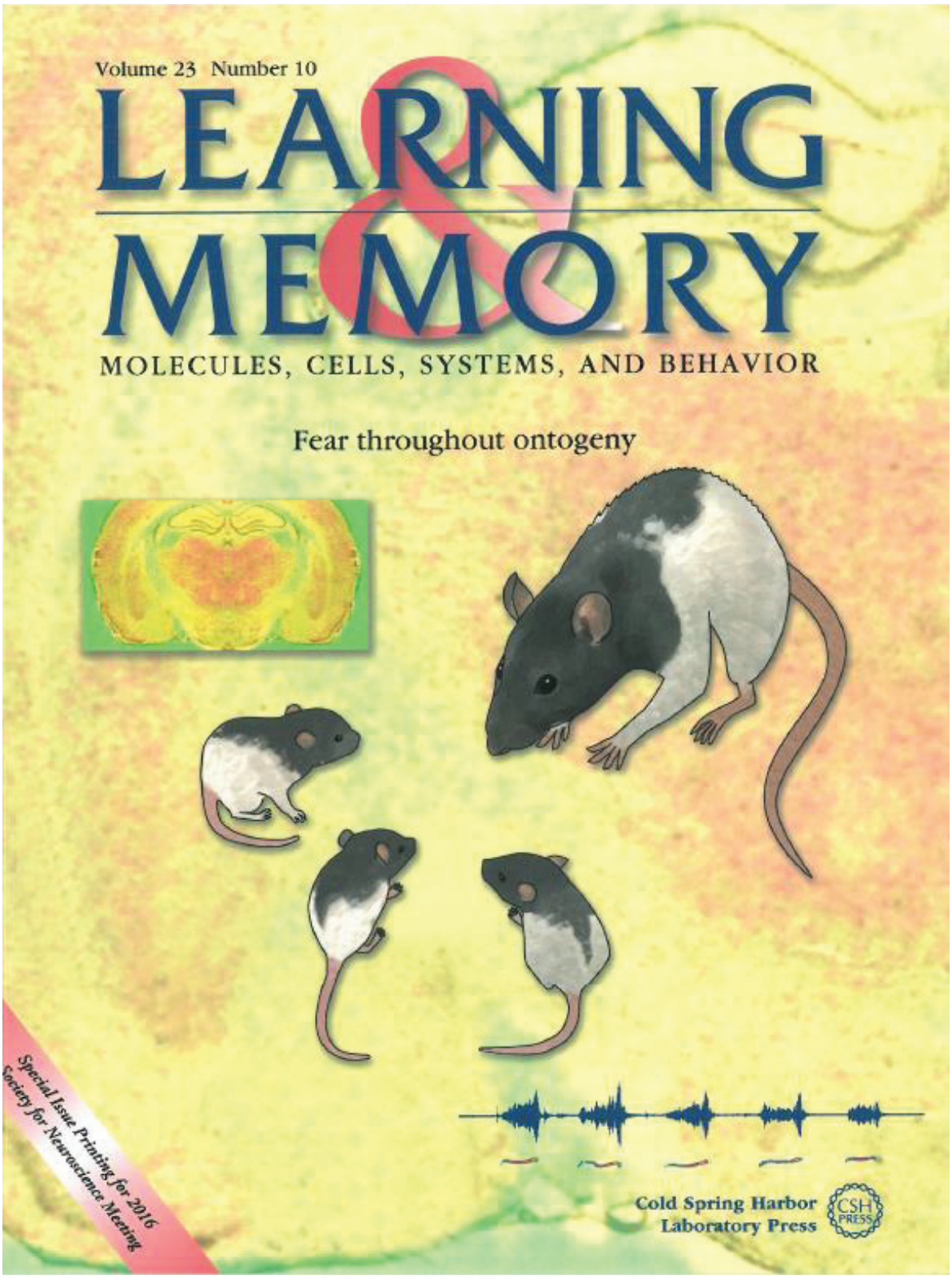
Boulanger Bertolus J, Verschueren A, Knippenberg J, Brown BL, Mouly A-M, Doyère V. Low and high frequency sounds lead to different acquisition of temporal anticipatory behavior in rats. *TIMELY Workshop: Temporal Processing Within and Across Senses*, Oct 2012, Tübingen, Allemagne.

Mouly A-M, Shionoya K, **Boulanger Bertolus J**, Ahers J, Londen E, Hegoburu C, Sullivan-Wilson T, Brown BL, Doyère V and Sullivan RM. Is time interval encoded in odor fear conditioning? *Society for Neuroscience*, Nov 2011, Washington D.C., USA.

Annexe 1 – Revue Ecologically relevant neurobehavioral assessment of the development of threat learning

Couverture du numéro de Learning & Memory dans lequel la revue de la littérature “Ecologically relevant neurobehavioral assessment of the development of threat learning” a été publiée

Réalisation : Alice et Julie Boulanger Bertolus



Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Review

Ecologically relevant neurobehavioral assessment of the development of threat learning

Julie Boulanger Bertolus,[1] Anne-Marie Mouly,[1] and Regina M. Sullivan[2]

[1]Lyon Neuroscience Research Center, INSERM U1028; CNRS UMR5292; University Lyon1, Lyon, France; [2]Emotional Brain Institute, Nathan Kline Institute, Child and Adolescent Psychiatry, New York University School of Medicine, New York, New York 10010, USA

As altricial infants gradually transition to adults, their proximate environment changes. In three short weeks, pups transition from a small world with the caregiver and siblings to a complex milieu rich in dangers as their environment expands. Such contrasting environments require different learning abilities and lead to distinct responses throughout development. Here, we will review some of the learned fear conditioned responses to threats in rats during their ontogeny, including behavioral and physiological measures that permit the assessment of learning and its supporting neurobiology from infancy through adulthood. In adulthood, odor–shock conditioning produces robust fear learning to the odor that depends upon the amygdala and related circuitry. Paradoxically, this conditioning in young pups fails to support fear learning and supports approach learning to the odor previously paired with shock. This approach learning is mediated by the infant attachment network that does not include the amygdala. During the age range when pups transition from the infant to the adult circuit (10–15 d old), pups have access to both networks: odor–shock conditioning in maternal presence uses the attachment circuit but the adult amygdala-dependent circuit when alone. However, throughout development (as young as 5 d old) the attachment associated learning can be overridden and amygdala-dependent fear learning supported, if the mother expresses fear in the presence of the pup. This social modulation of the fear permits the expression of defense reactions in life threatening situations informed by the caregiver but prevents the learning of the caregiver itself as a threat.

What an animal needs to learn to survive changes based on the phase of development. In altricial species for example, the primary focus of the newborn is to learn about the caregiver in a manner that produces approach and prosocial behaviors, while adults need to learn about food and danger that involve both approach and avoidance behaviors. This specialized infant learning system ensures attachment to the caregiver, including ensuring that the pair maintains contact and the infant receives the nutrition and nurturing required for normal neurobehavioral development. Learning of this attachment begins in utero (Pedersen and Blass 1982; Schaal et al. 1998; Mennella et al. 2001) but continues after birth and is supported by unique features of the neurobehavioral conditioning system (Coureaud et al. 2006; Pattwell et al. 2013; Callaghan et al. 2014; Perry and Sullivan 2014; Rincón-Cortés and Sullivan 2014). Over the course of development, this conditioning system gradually loses its unique infant characteristics and transitions into the adult system. Here we review the development of the attachment system and how it transitions to the threat conditioning system as the infant transitions to independence just a few weeks after birth.

Threat conditioning involves pairing an initially neutral conditional stimulus (CS), such as an odor or tone, with a fear-inducing stimulus, called the unconditioned stimulus (US), such as a mild electric shock. After a few CS–US pairings, the animal develops a conditioned threat or fear response to the CS cue (Pavlov 1927; Davis 1989; Fanselow 1994; LeDoux 2000). This Pavlovian learning is widely distributed in the animal kingdom, ranging from worms (Rankin 2004), fish (Overnier and Curnow 1969; Drew et al. 2005), birds (Longo et al. 1962), rodents (Davis 1989), nonhuman primates (Kalin et al. 2004), and humans (Delgado et al. 2006). While fear conditioning has been abundantly used in the rodent literature to investigate the neurobiology of learning and memory in adults, it also provides a useful template to highlight developmental differences in learning. Since the auditory and visual sensory system show delayed maturation in infant rodents, early life learning studies must rely on the olfactory system that is functional at birth (Alberts 1984).

It is not surprising that infant threat (odor–shock) conditioning and expression differs from adults since many of the brain areas considered critical in adult threat conditioning have delayed functional development during infancy (Crain et al. 1973; Rosselli-Austin and Altman 1979; Bayer 1980; McLean and Shipley 1991; Berdel et al. 1997; Sullivan et al. 2000a; Moriceau et al. 2006; Thompson et al. 2008; Raineki et al. 2010a). Indeed, developmental research has documented that as the brain matures and additional brain areas are incorporated into the learning circuit, the features of adult learning emerge (Stanton 2000; Sullivan et al. 2000a; Kim and Richardson 2010). But in this review, we go beyond this by describing how some of these brain areas show unique neurobehavioral functioning during development to permit age-specific learning and the learning of age relevant behaviors, rather than immature versions of adult learned responses.

Ontogenetic development of defense responses to natural threats: major transitions in expression at PN10 with amygdala emergence

Predator pressure varies throughout the animal's life and the ability to respond appropriately to each stage-specific threat is important for survival. Therefore, as the threat changes throughout the

Corresponding author: regina.sullivan@nyumc.org
Article is online at http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.042218.116.

© 2016 Boulanger Bertolus et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first 12 months after the full-issue publication date (see http://learnmem.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml). After 12 months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

animal's life, related defense responses also change (Pongrácz and Altbäcker 2000; Wiedenmayer 2009; Putman et al. 2015). Responses to threat in infancy are thus elicited by distinct stimuli and mediated by distinct neural circuits than in adults. While the main topic of this review is not defense responses per se, we briefly review these responses as they are used to study memory mechanisms through ontogeny.

In older pups and adults, threat conditioning produces a cue that has acquired threatening properties that are quite similar to responses to naturally threatening stimuli, especially in early life as the supporting neural networks and motor responses emerge. When an organism is confronted with a threat, it produces innately determined defensive behaviors, which are species-specific (Bolles 1970). In rats, the behavioral repertoire of defense reactions in response to an environmental threat is complex and varies with the animal's age and context of the threat. In adult rats, freezing is one of the most used behavioral measures of fear. It is a well-investigated species-specific defense reaction marked by an absence of all movement except for respiration (Blanchard and Blanchard 1969a; Bolles and Collier 1976). It is a complex behavior composed of many different behaviors, such as crouching, ears back, and piloerection, and has quickly become "the golden standard for assessing fear" (Maren 2008), especially since it allows computer-based scoring and automation of the measure (Anagnostaras et al. 2000). In pups, the onset of freezing behavior has been of interest as a way of understanding the ontogeny of defensive responding. By postnatal day (PN) 23 (weaning age), many of the components of the complex freezing response are present, although how they are combined and the duration of the subcomponents still differ from adults (Bolles and Woods 1964). Importantly pups do have a freezing response by PN10 as assessed by presentation of learned or naturally threatening odors, although the response is not as complex as adults and appears to be primarily defined as immobility with some muscle tension (Takahashi 1994a,b; Moriceau et al. 2004).

As we consider the development of threat behaviors, it should also be noted that the complex behavioral response to threat in adults depends on the level of fear and environmental options for behaviors. Specifically, hiding, freezing, or attacking is determined by whether or not an escape or hiding place is known, but also the proximity of the threat as well as its level and what the animal has learned about that threat. This is discussed in the literature as Predatory Imminence Continuum and suggests that the defensive responses will change as the level of threat changes (Blanchard and Blanchard 1969b, 1989; Bolles and Fanselow 1980). The main assumption of the Predatory Imminence Continuum is that as threat levels change, defensive response strategies change. For example, if a predator or threat is present and the animal is in a confined area without an escape route, adult rats will freeze, while they will escape if given the opportunity or attack if the predator is engaged. This has not been directly assessed in pups, although it appears that young pups and young children typically approach their caregiver when threatened (Rajecki et al. 1978), the option of attack does not emerge until after weaning age (Collier and Bolles 1980) and freezing to the predator odor has not yet developmentally emerged until PN10 (Takahashi 1992; Wiedenmayer and Barr 1998; Moriceau et al. 2004).

In the infant rodent research, because freezing does not emerge until PN10, assessment of threat responding has also relied on approach/avoidance tests to assess the functional emergence of responses to threatening cues, such as a Y-maze or a two-odor choice (Cornwell-Jones and Sobrian 1977; Haroutunian and Campbell 1979; Johanson and Teicher 1980; Kleitman and Satinoff 1982; Sullivan et al. 2000a). For example, newly born pups can approach a maternal odor and will avoid an odor previously paired with malaise induced by high shock or LiCl (Cornwell-Jones and Sobrian 1977; Rudy and Cheatle 1977; Haroutunian and Campbell 1979; Johanson and Teicher 1980; Kucharski and Spear 1984; Sullivan et al. 1986; Shionoya et al. 2006; Raineki et al. 2009).

Disruption of ongoing behaviors can also be used to measure defense responses, such as exploration, eating, drinking, or grooming. In adults, these behaviors have been shown to be inhibited in the presence of a threatening stimulus (Blanchard and Blanchard 1989; Blanchard et al. 1990). This inhibition of ongoing behavior in response to threat is also seen in pups as they transition to independence around weaning (Bronstein and Hirsch 1976), and includes reduced play (Siviy et al. 2006).

Ultrasonic vocalizations (USV) have also been used to assess the developmental emergence of threat responses. In adults, these vocalizations are emitted around 22 kHz in aversive contexts such as predator encounter (Blanchard et al. 1991; Brudzynski and Ociepa 1992), an agonistic situation (Lore et al. 1976; Van Der Poel and Miczek 1991), or in response to noxious stimuli (Kaltwasser 1990; Van Der Poel and Miczek 1991; Wöhr et al. 2005; Hegoburu et al. 2011). Newborn infant rats emit USVs around 40 kHz in physiologically challenging situations, such as cold distress or noxious stimulus such as shock (Allin and Banks 1971; Blumberg and Alberts 1990; Barr et al. 2015; Boulanger Bertolus et al. 2015). This USV response also occurs to removal of the mother within a temperature controlled environment and is presumably used as a distress call based on the removal of social stimuli and not the presentation of direct threat (Noirot 1968; Hofer and Shair 1978; Gandal et al. 2010; Bader et al. 2011; Shair 2014). Indeed, it is possible that removal of the caregiver might be a threat signal unique to early life, although this needs further exploration. Both adult and infant USVs are decreased by anxiolytic drugs and increased by anxiogenic drugs (Gardner 1985; Insel et al. 1986; Cuomo et al. 1988; Branchi et al. 2001; Jelen et al. 2003), suggesting that they reflect an aversive emotional state of the animal, although the pharmacology supporting infant and adult USV appears to diverge (Simola 2015). Moreover, at least in older pups with a functional amygdala (>PN10), the presence of an imminent threat, such as predator odor presentation, inhibits USV emission (Takahashi 1992; Shair et al. 1998; Hofer et al. 2001; Wiedenmayer and Barr 2001; Moriceau et al. 2004; Wiedenmayer et al. 2005). Therefore, USV are increased at all ages as the level of anxiety increases (e.g., sustained fear) and inhibited by phasic fear, reflecting a differential USV modulation by anxiety and fear (Jelen et al. 2003).

When animals, including rodents, are confronted with a threat, physiological changes also occur to prepare the organism to cope with and respond to danger. In both adults and infants older than PN10 these modifications of physiological parameters include analgesia (Wiedenmayer and Barr 1998), modification of heart rate, and respiratory rate that either increase or decrease depending on the age of the animal and the threat (Graham and Clifton 1966; Frysztak and Neafsey 1991; Stunden et al. 2001; Fewell et al. 2007), and increase of stress hormone levels (Wiedenmayer et al. 2003; Moriceau et al. 2004).

Ontogenetic development of learned defense responses: emergence of learned fear at PN10

Adults learn about threat through pairings of a neutral stimulus (such as odor or tone) with a noxious stimulus (US, such as shock), which produces a learned threat signal, the CS. Specifically, after conditioning, the CS elicits the same kind of behavioral and physiological responses than those observed for the aversive US, or preparatory responses for the predicted occurrence of the threat (i.e., US shock). This threat learning is widely distributed

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

in the animal kingdom, but how defensive behavior is measured differs between species (Kalin et al. 2004; Rankin 2004; Tottenham et al. 2011).

This fear learning is dependent upon the amygdala in adults (Fanselow and LeDoux 1999; Phelps 2006; Johansen et al. 2011; Hegoburu et al. 2014) and does not emerge in pups until PN10 (Haroutunian and Campbell 1979; Camp and Rudy 1988; Sullivan et al. 2000a), with functional development of the amygdala (Sullivan et al. 2000a; Raineki et al. 2009). However, the PN10 emergence of threat learning is confined to the olfactory and somatosensory systems and further delayed until PN15-16 when the CS is auditory, and PN17-18 when the CS is visual due to delayed maturation of these sensory systems (Moye and Rudy 1985; Hunt and Campbell 1997). Nevertheless, odor avoidance has been shown in fetal and perinatal rats: these pups learn to avoid an odor provided the learning involves malaise learning induced by either LiCl or high (1.0 mA) shock sufficient to induce internal malaise (Haroutunian and Campbell 1979; Smotherman 1982; Kucharski and Spear 1984; Raineki et al. 2009). Thus, odor avoidance learning due to gastric malaise has been demonstrated by using an avoidance task (or disruption of normal behavior) as early as fetal pups (Haroutunian and Campbell 1979; Smotherman 1982; Kucharski and Spear 1984; Raineki et al. 2009) while odor aversion due to fear learning is shown using either avoidance task or freezing in pups older than 9 d old (Sullivan et al. 2000a; Raineki et al. 2009). The divergence in age of expression of malaise and fear learning is due to dependence on different neural networks for learning: the olfactory bulb and piriform cortex are used for malaise learning until pups approach weaning age, while fear learning from PN10 depends upon the later developing amygdala (Shionoya et al. 2006; Raineki et al. 2009). Thus, dependence on the amygdala for two types of learning show divergent ages of functional inclusion of the amygdala in learning.

Similarly to what is observed in response to a predator odor or a shock, suppression of ongoing behavior and USV occurs in response to the learned CS in adults (Jelen et al. 2003; Wöhr et al. 2005; Maren 2008; Shionoya et al. 2013) and allows refined assessment of fear learning in pups at young ages (Pisano et al. 2012; Revillo et al. 2014). In very young pups, with limited motoric ability, learned threat responses have been measured using increased behavioral activity (Sullivan and Wilson 1993; Hunt 1997; Moriceau and Sullivan 2004a; Boulanger Bertolus et al. 2014). However, this behavioral activation reflects the infant's learning of the odor salience rather than its aversive value. Indeed, increases in behavioral activation in response to a learned odor during training are similarly observed whether the animal learns a preference or an aversion to that odor (Moriceau and Sullivan 2004a). Thus, an additional test that permits approach and avoidance behaviors is required to determine hedonic value.

Fear-potentiated startle is also a common measure of learned fear. It uses the subject's reflexive startle to a loud, unexpected sudden noise: when the subject is exposed to a threatening stimulus, the amplitude of the startle increases (Brown et al. 1951; Davis 1979). In pups, the development of fear-potentiated startle has been shown to be delayed compared with the development of acoustic startle (around PN11) (Anderson and Patrick 1934): it emerges at PN23 for visual (Hunt 1999), auditory (Hunt et al. 1994), and olfactory stimuli (Richardson et al. 2000). Thus, fear-potentiated startle can be used in pups beginning around weaning age.

Complementary to behavioral measures, physiological measures have also been widely used to assess learned responses to threat. They have the advantage to be less limited by the motor maturation of the pup and allow fine measure of the temporal response to the threatening CS, although they do not inform about its hedonic value and require the addition of a behavioral test. Specifically, a change in heart rate in response to a CS can be recorded as a measure of learning (Hunt et al. 1997; Fletcher and Wilson 2002), although based on our understanding of pups' paradoxical responses to threat (i.e., odor preference learning) changes in heart rate cannot distinguish between learned threat and preferences in young pups (<PN10, Fletcher and Wilson 2002). There are also developmental changes in the modulation (increase or decrease) of the heart rate. For example, Hunt et al. (1997) have shown that the presentation of an odor previously paired with a shock triggers an increase in heart rate in 16-d-old rats, while adult rats show a decrease in heart rate to the odor. The developmental switch to adult-like responding appears to occur around weaning: 23-d-old rats showed a dichotomous pattern of responding, while some pups showed infant-like conditioned responses and some showed adult-like responses (Hunt et al. 1997).

In adults, the respiratory frequency has also been shown to be affected by the rat's emotional arousal (Homma and Masaoka 2008) and aversive conditioning leads to increased respiratory frequency during the presentation of the conditioned stimulus in rats (Frysztak and Neafsey 1991; Shionoya et al. 2013). Interestingly, high temporal resolution analysis of the respiratory rate during the fearful conditioned stimulus presentation revealed the emergence of a temporal pattern linked to the duration of the interval between the onset of the CS and the arrival of the US, suggesting that the animals readily learn the temporal relationships between the two events (Shionoya et al. 2013). Importantly in pups, the respiratory response is also modulated by the duration of CS–US interval, allowing to assert that pups as young as PN12 are able to encode time (Boulanger Bertolus et al. 2014).

In conclusion, the repertoire of behavioral and physiological defense responses, either natural or learned, varies throughout development in relation to the maturation of the animal's sensory and motor abilities, but also on the maturity of the supporting brain structures (Anderson and Patrick 1934; Bolles and Woods 1964; Altman and Sudarshan 1975; Alberts 1984; Hunt and Campbell 1997; Stanton 2000; Pattwell et al. 2013; Perry and Sullivan 2014; Rincón-Cortés and Sullivan 2014). Overall, the measures used to assess threat responses must be adapted to the age of interest. In addition the use of complementary behavioral and physiological variables might be of great help for analyzing the ontogeny of fear.

Neurobiology of threat learning during very early development: Threats fail to engage the amygdala-dependent learning system and instead engage the attachment system

In the earliest days of life the amygdala is quite immature: neurogenesis is continuing (Bayer 1980), major nuclei subdivision are first discernible around PN7 and stabilizing around PN14 (Bayer 1980; Berdel et al. 1997), synaptic development begins to appear around PN5 and optimized between PN10-20 (Mizukawa et al. 1989; Ryan et al. 2014), and the amygdala undergoes remodeling through adolescence (Koss et al. 2014). This delayed amygdala development might account for the fact that pups younger than PN10 do not learn to fear an odor through odor–shock pairings when moderate shock levels are used (0.5 mA) and malaise is not produced (Haroutunian and Campbell 1979; Sullivan et al. 1986, 2000a; Camp and Rudy 1988; Roth and Sullivan 2001, 2003, 2005; Moriceau and Sullivan 2004a; Moriceau et al. 2006; Roth et al. 2006; Raineki et al. 2009, 2010b; Upton and Sullivan 2010). Indeed, this conditioning evokes approach responses in a Y-maze and behavioral activation when tested in a small container. In other words, threat learning is not observed before PN10,

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

which converges with the emergence of threat responses to natural threats discussed above (Moriceau et al. 2004). Specifically, the odor–shock conditioning procedure produces odor preference with behavioral expression similar to learning induced by pairing the odor with milk, suckling, tactile stimulation (to mimic mother grooming), or maternal care in the nest (Brake 1981; Alberts and May 1984; Sullivan and Leon 1986; Weldon et al. 1991; Raineki et al. 2010b; Roth et al. 2013). Learning to prefer an odor paired with an aversive stimulus occurs in spite of a functional pain system as assessed for instance, through shock induced vocalizations and escape-like behaviors (Small 1899; Anderson and Patrick 1934; Stehouwer and Campbell 1978; Fitzgerald and Gibson 1984; Emerich et al. 1985; Sullivan et al. 2000a; Sevelinges et al. 2011). Importantly, upon further behavioral testing, it became obvious that these myriad conditioning procedures (even those with aversive stimuli) do more than produce an odor preference, they support learning of a new maternal odor, and this odor takes on the properties to support pups' interaction with the mother and are sufficient for enabling nipple attachment (Raineki et al. 2010b; Rincón-Cortés et al. 2015), as would odor pairings with stroking (Pedersen et al. 1982; Raineki et al. 2010b).

We refer to this as the sensitive period for attachment learning and have suggested that this paradoxical preference learning from odor-pain pairings may be designed to ensure the infant always learns to approach the mother (Sullivan et al. 2000a), regardless of the quality of the care. The nest is not a pain free setting for pups: the mother steps on her pups during normal interactions, particularly when entering and leaving the nest (Roth and Sullivan 2005), and this infant learning system can ensure pups will learn an approach response to the mother regardless of its association with pain. Additionally, environmental stress and lack of resources can be associated with poor maternal care and more frequent mother–infant interactions associated with pain (Gilles et al. 1996; Roth and Sullivan 2005; Raineki et al. 2010b; Blaze et al. 2015). Thus, this system can also ensure that the infant learns approach responses to the mother regardless of the quality of care received (Roth and Sullivan 2005; Raineki et al. 2010b). As has been discussed earlier as we consider the development of threat conditioning, this neonatal learning system wanes as pups mature and begin to venture outside the nest (Bolles and Woods 1964; pups begin to walk between PN9 and PN11) and is replaced by learning more characteristic of adults, i.e., the odor–moderate shock pairings readily produces an odor aversion (Camp and Rudy 1988; Sullivan and Wilson 1995; Sullivan et al. 2000a).

There seems to be considerable phylogenetic conservation of this paradoxical pain associated attachment learning system because it has been identified in other species. For example, during imprinting in newly hatched chicks, shock associated with the caregiver (or surrogate) still produces the classic imprinting following behavior, although this learning only occurs during the critical period for imprinting (Pitz and Ross 1961; James and Binks 1963; Kovach and Hess 1963). A similar phenomenon has been shown in nonhuman primates (Seay et al. 1964; Suomi 1978; McCormack et al. 2006; Sanchez 2006) and dogs (Fisher 1955, cited in Rajecki et al. 1978). Finally, attachment to abusive caregivers also occurs in children suggesting that this phenomenon may exist in humans (Morton and Browne 1998; Helfer et al. 1999; Perry 2007).

This odor–shock olfactory classical conditioning, similar to odor paired with other rewards, such as milk and tactile stimulation, causes changes in the olfactory bulb as assessed by *c-Fos*, *2-DG*, and *pCreb* (Sullivan and Leon 1986; Wilson et al. 1987; Woo et al. 1987; Wilson and Leon 1988; Sullivan et al. 1990; Wilson and Sullivan 1990; Sullivan and Wilson 1991; Johnson et al. 1995; McLean et al. 1999; Yuan et al. 2002; Raineki et al. 2010b). During learning, the infant olfactory bulb principle output neurons (mitral and tufted cells) fail to habituate to the odor reward pairings, and continue to show robust responses (Wilson and Sullivan 1992). Controls, such as odor only or random odor–shock groups, fail to learn and habituate after a few presentations. The mitral cell response to odors is maintained by the reward induced norepinephrine (NE) release from the locus coeruleus (LC) onto mitral cells (Sullivan et al. 1992; Wilson and Sullivan 1992; Smith et al. 2009). Manipulation of NE within the bulb using receptor agonists and antagonists or manipulation of the NE source the LC (Shipley et al. 1985; McLean and Shipley 1991) show that NE is causal in supporting both learning induced olfactory bulb changes and the behavior (Sullivan et al. 1989, 1991, 1992, 1994, 2000b; Langdon et al. 1997; Yuan et al. 2003; Moriceau and Sullivan 2004a; Landers and Sullivan 2012; Shakhawat et al. 2012).

High levels of infant NE required to support this learning are available due to unique LC functioning during the neonatal sensitive period, when the LC has a robust and prolonged (20–30 sec) response to infant reward presentation (Nakamura et al. 1987). On the contrary, adult LC responses are measured in milliseconds (Nakamura et al. 1987). The age dependent difference in LC functioning appears to be due to developmental changes in LC autoreceptors with nonfunctional LC inhibitory $\alpha 2$ autoreceptors but robustly functioning $\alpha 1$ excitatory LC autoreceptors during the neonatal sensitive period (Nakamura et al. 1987; Nakamura and Sakaguchi 1990; Sullivan et al. 2000b; Moriceau and Sullivan 2004b). Just as the sensitive period ends, the role of NE becomes more adult-like and rather plays a modulatory role of enhancing or attenuating learning (Selden et al. 1990; Harris and Fitzgerald 1991; Moffat et al. 1993; Sara et al. 1995; Quirarte et al. 1997; Liang 1998; Roozendaal et al. 1999).

Beside the crucial role of the olfactory bulb and NE in the infant learning, several studies have also highlighted the implication of the anterior piriform cortex. The olfactory bulb sends dense projections to the anterior piriform cortex and to a lesser extent to posterior piriform cortex. In addition to the neural changes in the olfactory bulb described above, changes in the anterior piriform cortex are also necessary, and sufficient, for the expression of early odor preference learning (Morrison et al. 2013). Roth and Sullivan (2005) have shown increased *c-Fos* activation in both the olfactory bulb and the anterior piriform cortex, following odor preference training in rat pups. Similarly, Raineki et al (2009) showed that odor–mild shock induced preference was accompanied by selective 2-DG uptake in both the olfactory bulb and anterior piriform cortex.

Therefore, the learned preference to the odor displayed by pups in the sensitive period relies upon a specific network involving the olfactory bulb, and the anterior piriform cortex, with a unique role of NE and locus coeruleus functioning (Fig. 1, green circuit).

Emergence of amygdala-dependent fear learning

Fear learning emerges in rat pups around PN10 and is caused by the recruitment of the amygdala during the odor–shock conditioning (Sullivan et al. 2000a; Moriceau and Sullivan 2006; Moriceau et al. 2006; Raineki et al. 2009). Moreover, suppression of the amygdala using muscimol infusions blocks this threat learning (Moriceau and Sullivan 2006), which is consistent with the role of the adult amygdala in threat conditioning (for reviews, see Davis 1992; Fanselow and LeDoux 1999; Cahill et al. 2001; Maren 2001). In addition to amygdala, the posterior piriform cortex also appears to engage in threat learning by the end of the sensitive period (Moriceau et al. 2006; Roth et al. 2006; Raineki et al. 2009), which is also consistent with the adult literature (see below).

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

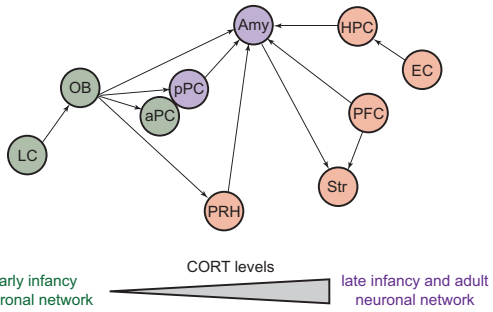


Figure 1. Neuronal networks underlying olfactory threat learning in the early infancy (<PN10, green), later in infancy (>PN10, purple), and at adulthood (red is added to purple). The transition from early infancy circuits to late infancy is mediated by the corticosterone (CORT) levels. (LC) locus coeruleus, (OB) olfactory bulb, (aPC) anterior piriform, (pPC) posterior piriform, (Amy) amygdala, (PRH) perirhinal cortex, (Str) striatum, (PFC) prefrontal cortex, (EC) entorhinal cortex, (HPC) hippocampus.

As the rat transitions to adulthood, an increasing number of structures have been shown to take part in olfactory threat learning. The involvement of the amygdala and posterior piriform cortex in learning the association between the odor and the shock has been confirmed at adulthood (Otto et al. 2000; Kilpatrick and Cahill 2003; Hegoburu et al. 2009, 2014; Sacco and Sacchetti 2010; Li 2014): learning of the odor–shock association modifies the response of the amygdala to natural and artificial odors (Funk and Amir 2000; Rosenkranz and Grace 2002; Sevelinges et al. 2004) and decreases its intrinsic excitability (Motanis et al. 2012), while suppressing amygdala functioning impairs olfactory threat learning (Cousens and Otto 1998; Wallace and Rosen 2001; Kilpatrick and Cahill 2003; Walker et al. 2005; Hegoburu et al. 2014). Moreover, learning-induced changes have been described in posterior piriform cortex (Hegoburu et al. 2009; Sevelinges et al. 2004) and lesion or inactivation of this structure was shown to affect long-term memories (Sacco and Sacchetti 2010; Hegoburu et al. 2014). The anterior piriform cortex also seems to be involved in the learning (Barnes et al. 2011; Wilson and Sullivan 2011), as the post-training disruption of its functioning leads to generalization of the learning. Indeed using a discriminative odor fear conditioning paradigm, the authors showed that when tested 24 h later, control rats presented a selective freezing response to the odor associated with a shock during training, while rats infused with baclofen in the anterior piriform cortex showed freezing to both reinforced and nonreinforced odors (Barnes and Wilson 2014).

In adults, beside the amygdala and piriform cortex, numerous other structures have been shown to exhibit changes following olfactory fear conditioning, from the earliest stages of olfactory processing (i.e., the olfactory receptors) (Jones et al. 2008; Kass et al. 2013), to associative cortices such as the entorhinal and perirhinal cortices (Herzog and Otto 1997; Funk and Amir 2000; Otto et al. 2000; Jones et al. 2007), but also structures such as the basal ganglia (Boulanger Bertolus et al. 2014) and medial prefrontal cortex (Funk and Amir 2000; Kim and Richardson 2010; Sotres-Bayon and Quirk 2010). The hippocampus and the prefrontal cortex (PFC) have also been involved in olfactory fear conditioning, although not in the learning of the odor–shock association per se. For example, the hippocampus has been shown to be involved both in the learning of an unimodal olfactory context in which odors are used to differentiate otherwise identical conditioning contexts (Otto and Poon 2006) and in learning the multimodal context in an olfactory fear conditioning paradigm (Raineki et al. 2010a).

In infancy, these structures slowly mature. Little is known about the functional maturation of the entorhinal and perirhinal cortices and of the basal ganglia, especially concerning their participation in odor fear conditioning at early ages. In contrast, the functional maturation of the hippocampus has been more investigated. For example the late developing hippocampus, with efferent connectivity to other brain areas occurring in the second week of life (Crain et al. 1973), does not support contextual learning until after weaning (PN21-23; Rudy et al. 1987; Rudy 1993, 1994; Rudy and Morledge 1994; Ivkovich et al. 2000), which has been causally linked to the emergence of the hippocampus (Raineki et al. 2010a). However, other forms of hippocampal-dependent learning occur at an earlier age (for review, see Stanton 2000). Furthermore, it is possible for this infant hippocampal-dependent learning to occur and not be expressed until a later time in life (Pattwell et al. 2011; Poulos et al. 2014).

To summarize, in infancy, olfactory threat learning depends upon the amygdala and the posterior piriform cortex (Fig. 1, purple circuit). At adulthood, other structures get involved in the conditioning, likely supporting the learning but also its modulation and contextualization (Fig. 1, red circuit).

Corticosterone is critical in the developmental onset of amygdala-dependent threat learning and social modulation of its levels switches fear learning on and off

The transition from infant to adult-like neural network of olfactory threat conditioning initially seemed quite abrupt in its emergence at PN10 (Sullivan et al. 2000a). While we originally thought the amygdala's lack of participation in younger pups' odor–shock conditioning/preference learning was due to the amygdala's immaturity, this was not the case. More careful analysis showed that the level of corticosterone (CORT) is critical in the emergence of pups conditioning, not the maturity of the amygdala. Indeed, at PN10, the endogenous level of CORT is sufficient to permit amygdala plasticity thus enabling pups' amygdala to participate in fear conditioning. Blood levels of pups' CORT correlate with whether or not pups learn threat, but more importantly, manipulation of CORT can switch fear leaning on or off (Moriceau et al. 2006; Moriceau and Sullivan 2006; Shionoya et al. 2007). Specifically, causation for the role of CORT in pup threat conditioning was demonstrated by manipulation of CORT through systemic injections or by intra-amygdala infusions during fear conditioning: increasing CORT supported learning and amygdala participation, while blocking CORT via system or intra-amygdala infusion blocked fear learning (Moriceau et al. 2006). The ability of CORT to control learning ends at PN15 (Upton and Sullivan 2010).

The ability of low CORT to block threat learning is unique to infancy, although CORT does play a modulatory role in adult fear and avoidance conditioning by increasing or decreasing learning strength (Pugh et al. 1997; Ferry et al. 1999; Hui et al. 2004; McGaugh 2004).

In pups, the mother controls pups' CORT levels (Stanton and Levine 1990; Suchecki et al. 1993), and through this mechanism the mother can block pups' amygdala-dependent fear learning (Wiedenmayer et al. 2003; Moriceau and Sullivan 2006). Specifically, in pups, maternal presence or just sensory stimulation from the mother (i.e., her odor, touch) maintains pups' low CORT levels and blocks CORT increase in response to shock (Levin et al. 1976; Stanton et al. 1987; Moriceau and Sullivan 2006; Shionoya et al. 2007; Gunnar et al. 2015). Indeed, when the pups are separated from the mother and lose this regulation, pups' CORT begins to rise in about an hour. This process of the mother blocking stress induced CORT release is called social buffering and

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

occurs in many species (Hennessy et al. 2009; Gee et al. 2014; Hostinar et al. 2014).

CORT control by the mother has a direct impact on infant conditioning by switching whether infants will learn avoidance or attachment. One potential mechanism for maternal modulation of pup CORT levels and odor learning is through its influence on the neural and noradrenergic activity of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), a brain area important for context-specific responses to diverse stressors and the site of CORT and NE interaction. Maternal presence attenuates both PVN neural activity and PVN NE levels during odor–shock conditioning (Shionoya et al. 2007). Furthermore, intra-PVN NE microinfusions initiates fear learning even in the presence of the mother, while blocking the NE receptors overrides the maternal blockade of fear learning. Together these data suggest that maternal control over pup learning acts through attenuation of PVN NE to reduce the CORT required for pup odor aversion learning. This dual learning of either approach or avoidance controlled by the mother highlights pups' continued maternal dependence for nursing, that requires approach, while enabling aversion learning outside the nest to prepare for pups' future independent living.

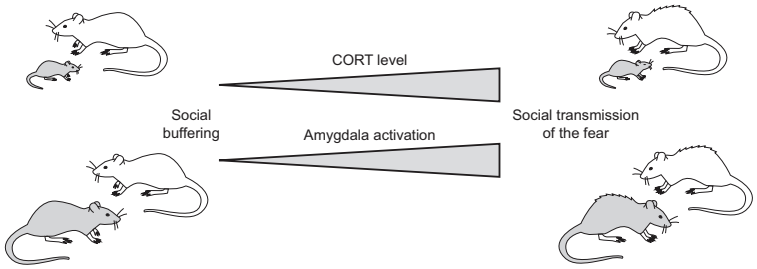


Figure 2. The social modulation of threat learning. During the post-sensitive period, the mother's presence can block fear learning by decreasing CORT levels in pups during acquisition. On the contrary, the presence of a frightened mother increases CORT levels in pups of all ages allowing them to learn from the mother's fear. Similarly in adult animals, presence of peers can modulate fear learning by acting on CORT levels. The CORT level modulates amygdala activation. While CORT levels can either increase or decrease fear learning, decreasing CORT's blockade of amygdala-dependent fear is unique to infancy. In the drawings, the gray animal is the test animal, while the white one is the conspecific (mother or peer) either buffering (*left* side) or transmitting (*right* side) the fear.

While the buffering of infant responses by the mother is the most robust and thoroughly investigated form of social buffering, social buffering of fear is also observed at older ages and in adult animals. As the animal matures, peers also become potent sources of social buffering (Hennessy et al. 2009). For instance, Terranova et al. (1999) reported that in periadolescent rats (PN35), the presence of a conspecific exerts a significant buffering effect on the novelty-induced increase in CORT levels. In adult rats, Kiyokawa et al. (2014) showed that the presence of a conspecific suppresses the learned fear response and HPA axis response to a level similar to those observed in the nonconditioned subjects. Interestingly, as observed for the mother-pup dyad, olfactory signals mediate the social buffering of conditioned fear responses (Takahashi et al. 2013; Kiyokawa 2015).

This social buffering at all ages of development also occurs in nonhuman primates and humans (Hennessy et al. 2009; Gunnar et al. 2015). In infancy, the parent can buffer the stress response of the infant (Smotherman et al. 1979; Gunnar and Donzella 2002). At adulthood, social groups reduce the HPA axis response to stress depending on the nature of the social bond (Stanton et al. 1985; Phillips et al. 2009).

Social transmission of fear: mother to infant

In contrast to its role in social buffering, maternal presence can also induce social transmission of fear learning to its progeny. In social fear learning, an organism learns fear through exposure to a conspecific expressing fear to a discrete conditioned stimulus. Debiec and Sullivan (2014) showed that maternal fear responses to a conditioned fear odor are sufficient to induce robust fear learning throughout infancy as early as PN6, with long-term retention. The transmission of fear from the mother to the pups is mediated by an alarm odor emitted by the frightened mother. Assessment of the involved mechanisms showed that maternal fear expression increases pups' stress hormone corticosterone and amygdala activation to induce this cue-specific fear learning (see Fig. 2). Suppressing pups' amygdala or preventing pups from mounting a stress response blocked this fear learning. Specific fears may thus be transferred across generations through maternal emotional communication and infant's associative learning mechanisms.

Social transmission of fear was also reported in adult rats. For instance, rats exposed to a novel tone in the presence of a cage-mate previously fear conditioned to that same tone, selectively showed increased freezing to the stimulus the next day (Bruchey et al. 2010). This suggests that, during memory retrieval, fear of a stimulus can be socially transmitted to a cage-mate. Similarly, Knapska and colleagues carried out an experiment in which rats were housed in pairs, and one of the two was fear conditioned to a context. After interacting with the conditioned cage-mate in the homecage, the remaining rat shows enhanced fear learning compared with controls when later conditioned (Knapska et al. 2010) and increased *c-Fos* labeling in the amygdala (Knapska et al. 2006). In rats, it has been shown that such social transmission of fear is mediated by alarm pheromones released from perianal region of the pheromone-donor rats (Kiyokawa et al. 2004) and detected by the vomeronasal organ and the Grueneberg ganglion of the receiver rat (Brechbühl et al. 2008; Kiyokawa et al. 2013; Kiyokawa 2015).

In humans, social transmission of fear has been also shown from the mother to her child: the infant regulates its behavior according to the caregiver's emotional expression. This is known as social referencing (Frith 2008). Besides, infants can learn from the pathological fear of their mothers (Murray et al. 2008; Bosquet Enlow et al. 2011). In adult humans, social transmission of anxiety has also been demonstrated: humans can discriminate stress-related bodily odors and such odors increase the anxiety of the smelling subject (Ackerl et al. 2002; Albrecht et al. 2011).

Therefore, throughout the animal's life, social environment can modulate fear responses to a threatening event, mainly through its influence on HPA axis to reduce stress hormone release. However, the social partner that can socially buffer the stress response changes with development, with the mother playing a major role during infancy, and peers/conspecifics being more potent sources of social buffering as the animal transitions to adulthood.

Conclusion

Learning about threat is a vital evolutionary ability shared throughout the phylogeny. However, in altricial species, such learning would be extremely detrimental if it occurred within

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

the nest where the only source of threat is also the only source of food and warmth, i.e., the caregiver. We reviewed the ontogeny of threat learning and highlighted the switch between learned preference and learned aversion as the pup matures and ventures outside the nest. Infant and adult learning are supported by distinct neuronal networks and the transition between these networks is under the influence of corticosterone levels. Importantly, the mother in infancy has the ability to modulate stress hormone levels, allowing the complete switch between threat and preference learning. While social buffering of CORT occurs at all ages and can modify fear learning in adults, its ability to block fear learning is unique to infancy (Hostinar et al. 2014).

The characteristics of fear learning in infancy described here in rats have strong parallels in humans. Indeed, attachment to an abusive caregiver as well as parental modulation of fear have been extensively described in human infants, reinforcing the idea that these phenomena are particularly suitable for translational studies.

Acknowledgments

This work was supported by grants DC009910, MH091451, HD083217 (R.M.S.), by Partner University Fund Emotion & Time (J.B.B., A.M.M., R.M.S.), LIA CNRS-NYU LearnEmoTime (J.B.B., A.M.M., R.M.S.), and the LABEX CORTEX (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR) (J.B.B., A.M.M.).

References

Ackerl K, Atzmueller M, Grammer K. 2002. The scent of fear. *Neuro Endocrinol Lett* **23:** 79–84.

Alberts JR. 1984. Sensory-perceptual development in the Norway rat: A view toward comparative studies. In *Comparative perspectives on the development of memory* (ed. Kail R, Spear NE), pp 65–101. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ.

Alberts JR, May B. 1984. Nonnutritive, thermotactile induction of filial huddling in rat pups. *Dev Psychobiol* **17:** 161–181.

Albrecht J, Demmel M, Schöpf V, Kleemann AM, Kopietz R, May J, Schreder T, Zernecke R, Brückmann H, Wiesmann M. 2011. Smelling chemosensory signals of males in anxious versus nonanxious condition increases state anxiety of female subjects. *Chem Senses* **36:** 19–27.

Allin JT, Banks EM. 1971. Effects of temperature on ultrasound production by infant albino rats. *Dev Psychobiol* **4:** 149–156.

Altman J, Sudarshan K. 1975. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim Behav* **23:** 896–920.

Anagnostaras SG, Josselyn SA, Frankland PW, Silva AJ. 2000. Computer-assisted behavioral assessment of Pavlovian fear conditioning in mice. *Learn Mem* **7:** 58–72.

Anderson AC, Patrick JR. 1934. Some early behavior patterns in the white rat. *Psychol Rev* **41:** 480–496.

Bader PL, Faizi M, Kim LH, Owen SF, Tadross MR, Alfa RW, Bett GCL, Tsien RW, Rasmusson RL, Shamloo M. 2011. Mouse model of Timothy syndrome recapitulates triad of autistic traits. *Proc Natl Acad Sci* **108:** 15432–15437.

Barnes DC, Wilson DA. 2014. Slow-wave sleep-imposed replay modulates both strength and precision of memory. *J Neurosci* **34:** 5134–5142.

Barnes DC, Chapuis J, Chaudhury D, Wilson DA. 2011. Odor fear conditioning modifies piriform cortex local field potentials both during conditioning and during post-conditioning sleep. *PLoS One* **6:** e18130.

Barr GA, Perry RE, Sullivan RM. 2015. Long and short term effects of the mother's presence during noxious stimulation in the infant rat. In 2015 Neuroscience Meeting Planner, Chicago, IL. http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?sKey=06236e9c-145a-4c1e-9ce9-e45431705722&cKey=ec1dfff4-138d-495c-a85e-d830337d6aa8&mKey=d0ff4555-8574-4fbb-b9d4-04eec8ba0c84.

Bayer SA. 1980. Quantitative 3H-thymidine radiographic analyses of neurogenesis on the rat amygdala. *J Comp Neurol* **194:** 845–875.

Berdel B, Moryś J, Maciejewska B. 1997. Neuronal changes in the basolateral complex during development of the amygdala of the ratfn2. *Int J Dev Neurosci* **15:** 755–765.

Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969a. Crouching as an index of fear. *J Comp Physiol Psychol* **67:** 370–375.

Blanchard RJ, Blanchard DC. 1969b. Passive and active reactions to fear-eliciting stimuli. *J Comp Physiol Psychol* **68:** 129–135.

Blanchard RJ, Blanchard DC. 1989. Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **13:** S3–S14.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Rodgers J, Weiss SM. 1990. The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neurosci Biobehav Rev* **14:** 463–472.

Blanchard RJ, Blanchard DC, Agullana R, Weiss SM. 1991. Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiol Behav* **50:** 967–972.

Blaze J, Asok A, Roth TL. 2015. The long-term impact of adverse caregiving environments on epigenetic modifications and telomeres. *Front Behav Neurosci* **9:** 79.

Blumberg MS, Alberts JR. 1990. Ultrasonic vocalizations by rat pups in the cold: an acoustic by-product of laryngeal braking? *Behav Neurosci* **104:** 808.

Bolles RC. 1970. Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychol Rev* **77:** 32–48.

Bolles RC, Collier AC. 1976. The effect of predictive cues on freezing in rats. *Anim Learn Behav* **4:** 6–8.

Bolles RC, Fanselow MS. 1980. A perceptual-defensive-recuperative model of fear and pain. *Behav Brain Sci* **3:** 291–301.

Bolles RC, Woods PJ. 1964. The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Anim Behav* **12:** 427–441.

Bosquet Enlow M, Kitts RL, Blood E, Bizarro A, Hofmeister M, Wright RJ. 2011. Maternal posttraumatic stress symptoms and infant emotional reactivity and emotion regulation. *Infant Behav Dev* **34:** 487–503.

Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers JL, Londen E, Rousselot J, Szyba K, Thévenet M, Sullivan-Wilson TA, Doyère V, Sullivan RM, et al. 2014. Infant rats can learn time intervals before the maturation of the striatum: evidence from odor fear conditioning. *Front Behav Neurosci* **8:** 176.

Boulanger Bertolus J, Rincón-Cortés M, Sullivan RM, Mouly A-M. 2015. Ontogeny of ultrasonic vocalization and respiratory responses to an aversive event in rats. In 2015 Neuroscience Meeting Planner, Chicago, IL. http://www.abstractsonline.com/Plan/ViewAbstract.aspx?sKey=8fbbb6eb-f987-4961-a645-1a996e542f84&cKey=bc3700ef-310a-4d78-b03f-71a18c1b91da&mKey=d0ff4555-8574-4fbb-b9d4-04eec8ba0c84.

Brake SC. 1981. Suckling infant rats learn a preference for a novel olfactory stimulus paired with milk delivery. *Science* **211:** 506–508.

Branchi I, Santucci D, Alleva E. 2001. Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behav Brain Res* **125:** 49–56.

Brechbühl J, Klaey M, Broillet M-C. 2008. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. *Science* **321:** 1092–1095.

Bronstein PM, Hirsch SM. 1976. Ontogeny of defensive reactions in Norway rats. *J Comp Physiol Psychol* **90:** 620–629.

Brown JS, Kalish HI, Farber EI. 1951. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol* **41:** 317–328.

Bruchey AK, Jones CE, Monfils M-H. 2010. Fear conditioning by-proxy: social transmission of fear during memory retrieval. *Behav Brain Res* **214:** 80–84.

Brudzynski SM, Ociepa D. 1992. Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. *Physiol Behav* **52:** 655–660.

Cahill L, McGaugh JL, Weinberger NM. 2001. The neurobiology of learning and memory: some reminders to remember. *Trends Neurosci* **24:** 578–581.

Callaghan BL, Sullivan RM, Howell B, Tottenham N. 2014. The international society for developmental psychobiology Sackler symposium: early adversity and the maturation of emotion circuits - A cross-species analysis. *Dev Psychobiol* **56:** 1635–1650.

Camp LL, Rudy JW. 1988. Changes in the categorization of appetitive and aversive events during postnatal development of the rat. *Dev Psychobiol* **21:** 25–42.

Collier AC, Bolles RC. 1980. The ontogenesis of defensive reactions to shock in preweanling rats. *Dev Psychobiol* **13:** 141–150.

Cornwell-Jones C, Sobrian SK. 1977. Development of odor-guided behavior in Wistar and Spraque-Dawley rat pups. *Physiol Behav* **19:** 685–688.

Coureaud G, Moncomble A-S, Montigny D, Dewas M, Perrier G, Schaal B. 2006. A pheromone that rapidly promotes learning in the newborn. *Curr Biol* **16:** 1956–1961.

Cousens G, Otto T. 1998. Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* **112:** 1092–1103.

Crain B, Cotman C, Taylor D, Lynch G. 1973. A quantitative electron microscopic study of synaptogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Brain Res* **63:** 195–204.

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Cuomo V, Cagiano R, De Salvia MA, Maselli MA, Renna G, Racagni G. 1988. Ultrasonic vocalization in response to unavoidable aversive stimuli in rats: effects of benzodiazepines. *Life Sci* **43:** 485–491.
Davis M. 1979. Diazepam and flurazepam: Effects on conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* **62:** 1–7.
Davis M. 1989. Neural systems involved in fear-potentiated startle. *Ann N Y Acad Sci* **563:** 165–183.
Davis M. 1992. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annu Rev Neurosci* **15:** 353–375.
Debiec J, Sullivan RM. 2014. Intergenerational transmission of emotional trauma through amygdala-dependent mother-to-infant transfer of specific fear. *Proc Natl Acad Sci* **111:** 12222–12227.
Delgado MR, Olsson A, Phelps EA. 2006. Extending animal models of fear conditioning to humans. *Biol Psychol* **73:** 39–48.
Drew MR, Zupan B, Cooke A, Couvillon PA, Balsam PD. 2005. Temporal control of conditioned responding in goldfish. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **31:** 31–9.
Emerich DF, Scalzo FM, Enters EK, Spear NE, Spear LP. 1985. Effects of 6-hydroxydopamine-induced catecholamine depletion on shock-precipitated wall climbing of infant rat pups. *Dev Psychobiol* **18:** 215–227.
Fanselow MS. 1994. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychon Bull Rev* **1:** 429–438.
Fanselow MS, LeDoux JE. 1999. Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala. *Neuron* **23:** 229–232.
Ferry B, Roozendaal B, McGaugh JL. 1999. Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdala. *Biol Psychiatry* **46:** 1140–1152.
Fewell JE, Zhang C, Gillis AM. 2007. Influence of adenosine A1-receptor blockade and vagotomy on the gasping and heart rate response to hypoxia in rats during early postnatal maturation. *J Appl Physiol* **103:** 1234–1241.
Fisher AE. 1955. "The effects of differential early treatment on the social and exploratory behavior of puppies." Doctoral dissertation, Pennsylvania State University.
Fitzgerald M, Gibson S. 1984. The postnatal physiological and neurochemical development of peripheral sensory C fibres. *Neuroscience* **13:** 933–944.
Fletcher ML, Wilson DA. 2002. Experience modifies olfactory acuity: acetylcholine-dependent learning decreases behavioral generalization between similar odorants. *J Neurosci* **22:** RC201.
Frith CD. 2008. Social cognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363:** 2033–2039.
Frysztak RJ, Neafsey EJ. 1991. The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, "freezing," and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. *Cereb Cortex* **1:** 418–425.
Funk D, Amir S. 2000. Enhanced Fos expression within the primary olfactory and limbic pathways induced by an aversive conditioned odor stimulus. *Neuroscience* **98:** 403–406.
Gandal MJ, Edgar JC, Ehrlichman RS, Mehta M, Roberts TPL, Siegel SJ. 2010. Validating γ oscillations and delayed auditory responses as translational biomarkers of autism. *Biol Psychiatry* **68:** 1100–1106.
Gardner CR. 1985. Distress vocalization in rat pups a simple screening method for anxiolytic drugs. *J Pharmacol Methods* **14:** 181–187.
Gee DG, Gabard-Durnam L, Telzer EH, Humphreys KL, Goff B, Shapiro M, Flannery J, Lumian DS, Fareri DS, Caldera C, et al. 2014. Maternal buffering of human amygdala-prefrontal circuitry during childhood but not during adolescence. *Psychol Sci* **25:** 2067–2078.
Gilles EE, Schultz L, Baram TZ. 1996. Abnormal corticosterone regulation in an immature rat model of continuous chronic stress. *Pediatr Neurol* **15:** 114–119.
Graham FK, Clifton RK. 1966. Heart-rate change as a component of the orienting response. *Psychol Bull* **65:** 305–320.
Gunnar MR, Donzella B. 2002. Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology* **27:** 199–220.
Gunnar MR, Hostinar CE, Sanchez MM, Tottenham N, Sullivan RM. 2015. Parental buffering of fear and stress neurobiology: reviewing parallels across rodent, monkey, and human models. *Soc Neurosci* **10:** 474–478.
Haroutunian V, Campbell BA. 1979. Emergence of interoceptive and exteroceptive control of behavior in rats. *Science* **205:** 927–929.
Harris GC, Fitzgerald RD. 1991. Locus coeruleus involvement in the learning of classically conditioned bradycardia. *J Neurosci* **11:** 2314–2320.
Hegoburu C, Sevelinges Y, Thévenet M, Gervais R, Parrot S, Mouly A-M. 2009. Differential dynamics of amino acid release in the amygdala and olfactory cortex during odor fear acquisition as revealed with simultaneous high temporal resolution microdialysis. *Learn Mem* **16:** 687–697.
Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Mouly A-M. 2011. The RUB cage: respiration–ultrasonic vocalizations–behavior acquisition setup for assessing emotional memory in rats. *Front Behav Neurosci* **5:** 25.
Hegoburu C, Parrot S, Ferreira G, Mouly A-M. 2014. Differential involvement of amygdala and cortical NMDA receptors activation upon encoding in odor fear memory. *Learn Mem* **21:** 651–655.
Helfer ME, Kempe RS, Krugman RD. 1999. *The Battered Child*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
Hennessy MB, Kaiser S, Sachser N. 2009. Social buffering of the stress response: diversity, mechanisms, and functions. *Front Neuroendocrinol* **30:** 470–482.
Herzog C, Otto T. 1997. Odor-guided fear conditioning in rats: 2. Lesions of the anterior perirhinal cortex disrupt fear conditioned to the explicit conditioned stimulus but not to the training context. *Behav Neurosci* **111:** 1265–1272.
Hofer MA, Shair H. 1978. Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-week-old rats. *Dev Psychobiol* **11:** 495–504.
Hofer MA, Shair HN, Brunelli SA. 2001. Ultrasonic vocalizations in rat and mouse pups. In *Current Protocols in Neuroscience*, John Wiley & Sons, New York.
Homma I, Masaoka Y. 2008. Breathing rhythms and emotions. *Exp Physiol* **93:** 1011–1021.
Hostinar CE, Sullivan RM, Gunnar MR. 2014. Psychobiological mechanisms underlying the social buffering of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis: a review of animal models and human studies across development. *Psychol Bull* **140:** 256–282.
Hui GK, Figueroa IR, Poytress BS, Roozendaal B, McGaugh JL, Weinberger NM. 2004. Memory enhancement of classical fear conditioning by post-training injections of corticosterone in rats. *Neurobiol Learn Mem* **81:** 67–74.
Hunt PS. 1997. Retention of conditioned autonomic and behavioral responses in preweanling rats: forgetting and reinstatement. *Anim Learn Behav* **25:** 301–311.
Hunt PS. 1999. A further investigation of the developmental emergence of fear-potentiated startle in rats. *Dev Psychobiol* **34:** 281–291.
Hunt PS, Campbell BA. 1997. Developmental dissociation of the components of conditioned fear. In *Learning, motivation, and cognition: The functional behaviorism of Robert C. Bolles* (ed. Bouton ME, Fanselow MS), pp. 53–74. American Psychological Association, Washington, DC.
Hunt PS, Richardson R, Campbell BA. 1994. Delayed development of fear-potentiated startle in rats. *Behav Neurosci* **108:** 69–80.
Hunt PS, Hess MF, Campbell BA. 1997. Conditioned cardiac and behavioral response topography to an olfactory CS dissociates with age. *Anim Learn Behav* **25:** 53–61.
Insel TR, Hill JL, Mayor RB. 1986. Rat pup ultrasonic isolation calls: possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. *Pharmacol Biochem Behav* **24:** 1263–1267.
Ivkovich D, Paczkowski CM, Stanton ME. 2000. Ontogeny of delay versus trace eyeblink conditioning in the rat. *Dev Psychobiol* **36:** 148–160.
James H, Binks C. 1963. Escape and avoidance learning in newly hatched domestic chicks. *Science* **139:** 1293–1294.
Jelen P, Soltysik S, Zagrodzka J. 2003. 22-kHz Ultrasonic vocalization in rats as an index of anxiety but not fear: behavioral and pharmacological modulation of affective state. *Behav Brain Res* **141:** 63–72.
Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. 2011. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* **147:** 509–524.
Johanson IB, Teicher MH. 1980. Classical conditioning of an odor preference in 3-day-old rats. *Behav Neural Biol* **29:** 132–136.
Johnson BA, Woo CC, Duong H, Nguyen V, Leon M. 1995. A learned odor evokes an enhanced Fos-like glomerular response in the olfactory bulb of young rats. *Brain Res* **699:** 192–200.
Jones SV, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ. 2007. Differential regional expression of brain-derived neurotrophic factor following olfactory fear learning. *Learn Mem* **14:** 816–820.
Jones SV, Choi DC, Davis M, Ressler KJ. 2008. Learning-dependent structural plasticity in the adult olfactory pathway. *J Neurosci* **28:** 13106–13111.
Kalin NH, Shelton SE, Davidson RJ. 2004. The role of the central nucleus of the amygdala in mediating fear and anxiety in the primate. *J Neurosci* **24:** 5506–5515.
Kaltwasser MT. 1990. Startle-inducing acoustic stimuli evoke ultrasonic vocalization in the rat. *Physiol Behav* **48:** 13–17.
Kass MD, Rosenthal MC, Pottackal J, McGann JP. 2013. Fear learning enhances neural responses to threat-predictive sensory stimuli. *Science* **342:** 1389–1392.
Kilpatrick L, Cahill L. 2003. Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* **117:** 184–188.
Kim JH, Richardson R. 2010. New findings on extinction of conditioned fear early in development: theoretical and clinical implications. *Biol Psychiatry* **67:** 297–303.

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Kiyokawa Y. 2015. Social odors: alarm pheromones and social buffering. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, pp. 1–19, Springer, Berlin, Heidelberg. http://link.springer.com/chapter/10.1007/7854_2015_406.
Kiyokawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. 2004. Alarm pheromones with different functions are released from different regions of the body surface of male rats. *Chem Senses* **29:** 35–40.
Kiyokawa Y, Kodama Y, Kubota T, Takeuchi Y, Mori Y. 2013. Alarm pheromone is detected by the vomeronasal organ in male rats. *Chem Senses* **38:** 661–668.
Kiyokawa Y, Hiroshima S, Takeuchi Y, Mori Y. 2014. Social buffering reduces male rats' behavioral and corticosterone responses to a conditioned stimulus. *Horm Behav* **65:** 114–118.
Kleitman N, Satinoff E. 1982. Thermoregulatory behavior in rat pups from birth to weaning. *Physiol Behav* **29:** 537–541.
Knapska E, Nikolaev E, Boguszewski P, Walasek G, Blaszczyk J, Kaczmarek L, Werka T. 2006. Between-subject transfer of emotional information evokes specific pattern of amygdala activation. *Proc Natl Acad Sci* **103:** 3858–3862.
Knapska E, Mikosz M, Werka T, Maren S. 2010. Social modulation of learning in rats. *Learn Mem* **17:** 35–42.
Koss WA, Belden CE, Hristov AD, Juraska JM. 2014. Dendritic remodeling in the adolescent medial prefrontal cortex and the basolateral amygdala of male and female rats. *Synapse* **68:** 61–72.
Kovach JK, Hess EH. 1963. Imprinting: effects of painful stimulation upon the following response. *J Comp Physiol Psychol* **56:** 461–464.
Kucharski D, Spear NE. 1984. Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Dev Psychobiol* **17:** 465–479.
Landers MS, Sullivan RM. 2012. The development and neurobiology of infant attachment and fear. *Dev Neurosci* **34:** 101–114.
Langdon PE, Harley CW, McLean JH. 1997. Increased β adrenoceptor activation overcomes conditioned olfactory learning deficits induced by serotonin depletion. *Dev Brain Res* **102:** 291–293.
LeDoux JE. 2000. Emotion circuits in the Brain. *Annu Rev Neurosci* **23:** 155–184.
Levin R, Fitzpatrick KM, Levine S. 1976. Maternal influences on the ontogeny of basal levels of plasma corticosterone in the rat. *Horm Behav* **7:** 41–48.
Li W. 2014. Learning to smell danger: acquired associative representation of threat in the olfactory cortex. *Front Behav Neurosci* **8:** 98.
Liang KC. 1998. Pretraining infusion of DSP-4 into the amygdala impaired retention in the inhibitory avoidance task: involvement of norepinephrine but not serotonin in memory facilitation. *Chin J Physiol* **41:** 223–233.
Longo N, Milstein S, Bitterman ME. 1962. Classical conditioning in the pigeon: exploratory studies of partial reinforcement. *J Comp Physiol Psychol* **55:** 983–986.
Lore R, Flannelly K, Farina P. 1976. Ultrasounds produced by rats accompany decreases in intraspecific fighting. *Aggress Behav* **2:** 175–181.
Maren S. 2001. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. *Annu Rev Neurosci* **24:** 897–931.
Maren S. 2008. Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur J Neurosci* **28:** 1661–1666.
McCormack K, Sanchez MM, Bardi M, Maestripieri D. 2006. Maternal care patterns and behavioral development of rhesus macaque abused infants in the first 6 months of life. *Dev Psychobiol* **48:** 537–550.
McGaugh JL. 2004. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu Rev Neurosci* **27:** 1–28.
McLean JH, Shipley MT. 1991. Postnatal development of the noradrenergic projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *J Comp Neurol* **304:** 467–477.
McLean JH, Harley CW, Darby-King A, Yuan Q. 1999. pCREB in the neonate rat olfactory bulb is selectively and transiently increased by odor preference–conditioned training. *Learn Mem* **6:** 608–618.
Mennella JA, Jagnow CP, Beauchamp GK. 2001. Prenatal and postnatal flavor learning by human infants. *Pediatrics* **107:** e88.
Mizukawa K, Tseng I-M, Otsuka N. 1989. Quantitative electron microscopic analysis of postnatal development of zinc-positive nerve endings in the rat amygdala using Timm's sulphide silver technique. *Dev Brain Res* **50:** 197–203.
Moffat SD, Suh EJ, Fleming AS. 1993. Noradrenergic involvement in the consolidation of maternal experience in postpartum rats. *Physiol Behav* **53:** 805–811.
Moriceau S, Sullivan RM. 2004a. Corticosterone influences on mammalian neonatal sensitive-period learning. *Behav Neurosci* **118:** 274–281.
Moriceau S, Sullivan RM. 2004b. Unique neural circuitry for neonatal olfactory learning. *J Neurosci* **24:** 1182–1189.
Moriceau S, Sullivan RM. 2006. Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy. *Nat Neurosci* **9:** 1004–1006.
Moriceau S, Roth TL, Okotoghaide T, Sullivan RM. 2004. Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. *Int J Dev Neurosci* **22:** 415–422.
Moriceau S, Wilson DA, Levine S, Sullivan RM. 2006. Dual circuitry for odor–shock conditioning during infancy: corticosterone switches between fear and attraction via amygdala. *J Neurosci* **26:** 6737–6748.
Morrison GL, Fontaine CJ, Harley CW, Yuan Q. 2013. A role for the anterior piriform cortex in early odor preference learning: evidence for multiple olfactory learning structures in the rat pup. *J Neurophysiol* **110:** 141–152.
Morton N, Browne KD. 1998. Theory and observation of attachment and its relation to child maltreatment: a review. *Child Abuse Negl* **22:** 1093–1104.
Motanis H, Maroun M, Barkai E. 2012. Learning-induced bidirectional plasticity of intrinsic neuronal excitability reflects the valence of the outcome. *Cereb Cortex* **24:** 1075–1087.
Moye TB, Rudy JW. 1985. Ontogenesis of learning: VI. Learned and unlearned responses to visual stimulation in the infant hooded rat. *Dev Psychobiol* **18:** 395–409.
Murray L, De Rosnay M, Pearson J, Bergeron C, Schofield E, Royal-Lawson M, Cooper PJ. 2008. Intergenerational transmission of social anxiety: the role of social referencing processes in infancy. *Child Dev* **79:** 1049–1064.
Nakamura S, Sakaguchi T. 1990. Development and plasticity of the locus coeruleus: a review of recent physiological and pharmacological experimentation. *Prog Neurobiol* **34:** 505–526.
Nakamura S, Kimura F, Sakaguchi T. 1987. Postnatal development of electrical activity in the locus coeruleus. *J Neurophysiol* **58:** 510–524.
Noirot E. 1968. Ultrasounds in young rodents. II. Changes with age in albino rats. *Anim Behav* **16:** 129–134.
Otto T, Poon P. 2006. Dorsal hippocampal contributions to unimodal contextual conditioning. *J Neurosci* **26:** 6603–6609.
Otto T, Cousens G, Herzog C. 2000. Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. *Behav Brain Res* **110:** 119–128.
Overnier JB, Curnow PF. 1969. Classical conditioning, pseudoconditioning, and sensitization in "normal" and forebrainless goldfish. *J Comp Physiol Psychol* **68:** 193–198.
Pattwell SS, Bath KG, Casey BJ, Ninan I, Lee FS. 2011. Selective early-acquired fear memories undergo temporary suppression during adolescence. *Proc Natl Acad Sci* **108:** 1182–1187.
Pattwell SS, Mouly A-M, Sullivan RM, Lee FS. 2013. Developmental components of fear and anxiety in animal models. In *Neurobiology of mental illness* (ed. Charney DS, Buxbaum JD, Sklar P, Nestler EJ), pp. 593–605, Oxford University Press, New York.
Pavlov IP. 1927. *Conditioned reflexes*. Oxford University Press, Humphrey Milford, London.
Pedersen PE, Blass EM. 1982. Prenatal and postnatal determinants of the 1st suckling episode in albino rats. *Dev Psychobiol* **15:** 349–355.
Pedersen PE, Williams CL, Blass EM. 1982. Activation and odor conditioning of suckling behavior in 3-day-old albino rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **8:** 329–341.
Perry BD. 2007. *Maltreated children: experience, brain development and the next generation*. WW Norton & Company Incorporated, New York.
Perry R, Sullivan RM. 2014. Neurobiology of attachment to an abusive caregiver: short-term benefits and long-term costs. *Dev Psychobiol* **56:** 1626–1634.
Phelps EA. 2006. Emotion and cognition: insights from studies of the human amygdala. *Annu Rev Psychol* **57:** 27–53.
Phillips AC, Gallagher S, Carroll D. 2009. Social support, social intimacy, and cardiovascular reactions to acute psychological stress. *Ann Behav Med* **37:** 38–45.
Pisano MV, Ferreras S, Krapacher FA, Paglini G, Arias C. 2012. Re-examining the ontogeny of the context preexposure facilitation effect in the rat through multiple dependent variables. *Behav Brain Res* **233:** 176–190.
Pitz GF, Ross RB. 1961. Imprinting as a function of arousal. *J Comp Physiol Psychol* **54:** 602–604.
Pongrácz P, Altbäcker V. 2000. Ontogeny of the responses of European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to aerial and ground predators. *Can J Zool* **78:** 655–665.
Poulos AM, Reger M, Mehta N, Zhuravka I, Sterlace SS, Gannam C, Hovda DA, Giza CC, Fanselow MS. 2014. Amnesia for early life stress does not preclude the adult development of posttraumatic stress disorder symptoms in rats. *Biol Psychiatry* **76:** 306–314.
Pugh CR, Tremblay D, Fleshner M, Rudy JW. 1997. A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. *Behav Neurosci* **111:** 503–511.
Putman BJ, Coss RG, Clark RW. 2015. The ontogeny of antipredator behavior: age differences in California ground squirrels

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

(*Otospermophilus beecheyi*) at multiple stages of rattlesnake encounters. *Behav Ecol Sociobiol* **69:** 1447–1457.
Quirarte GL, Roozendaal B, McGaugh JL. 1997. Glucocorticoid enhancement of memory storage involves noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci* **94:** 14048–14053.
Raineki C, Shionoya K, Sander K, Sullivan RM. 2009. Ontogeny of odor-LiCl vs. odor-shock learning: similar behaviors but divergent ages of functional amygdala emergence. *Learn Mem* **16:** 114–121.
Raineki C, Holman PJ, Debiec J, Bugg M, Beasley A, Sullivan RM. 2010a. Functional emergence of the hippocampus in context fear learning in infant rats. *Hippocampus* **20:** 1037–1046.
Raineki C, Moriceau S, Sullivan RM. 2010b. Developing a neurobehavioral animal model of infant attachment to an abusive caregiver. *Biol Psychiatry* **67:** 1137–1145.
Rajecki DW, Lamb ME, Obmascher P. 1978. Toward a general theory of infantile attachment: a comparative review of aspects of the social bond. *Behav Brain Sci* **1:** 417–436.
Rankin CH. 2004. Invertebrate learning: what can't a worm learn? *Curr Biol* **14:** R617–R618.
Revillo DA, Paglini MG, Arias C. 2014. Spontaneous recovery from extinction in the infant rat. *Behav Brain Res* **274:** 149–157.
Richardson R, Paxinos G, Lee J. 2000. The ontogeny of conditioned odor potentiation of startle. *Behav Neurosci* **114:** 1167–1173.
Rincón-Cortés M, Sullivan RM. 2014. Early life trauma and attachment: immediate and enduring effects on neurobehavioral and stress axis development. *Front Endocrinol (Lausanne)* **5:** 33.
Rincón-Cortés M, Barr GA, Mouly AM, Shionoya K, Nuñez BS, Sullivan RM. 2015. Enduring good memories of infant trauma: rescue of adult neurobehavioral deficits via amygdala serotonin and corticosterone interaction. *Proc Natl Acad Sci* **112:** 881–886.
Roozendaal B, Nguyen BT, Power AE, McGaugh JL. 1999. Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *Proc Natl Acad Sci* **96:** 11642–11647.
Rosenkranz JA, Grace AA. 2002. Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during Pavlovian conditioning. *Nature* **417:** 282–287.
Rosselli-Austin L, Altman J. 1979. The postnatal development of the main olfactory bulb of the rat. *J Dev Physiol* **1:** 295–313.
Roth TL, Sullivan RM. 2001. Endogenous opioids and their role in odor preference acquisition and consolidation following odor–shock conditioning in infant rats. *Dev Psychobiol* **39:** 188–198.
Roth TL, Sullivan RM. 2003. Consolidation and expression of a shock-induced odor preference in rat pups is facilitated by opioids. *Physiol Behav* **78:** 135–142.
Roth TL, Sullivan RM. 2005. Memory of early maltreatment: neonatal behavioral and neural correlates of maternal maltreatment within the context of classical conditioning. *Biol Psychiatry* **57:** 823–831.
Roth TL, Moriceau S, Sullivan RM. 2006. Opioid modulation of Fos protein expression and olfactory circuitry plays a pivotal role in what neonates remember. *Learn Mem* **13:** 590–598.
Roth TL, Raineki C, Salstein L, Perry R, Sullivan-Wilson TA, Sloan A, Lalji B, Hammock E, Wilson DA, Levitt P, et al. 2013. Neurobiology of secure infant attachment and attachment despite adversity: a mouse model. *Genes Brain Behav* **12:** 673–680.
Rudy JW. 1993. Contextual conditioning and auditory cue conditioning dissociate during development. *Behav Neurosci* **107:** 887–891.
Rudy JW. 1994. Ontogeny of context-specific latent inhibition of conditioned fear: implications for configural associations theory and hippocampal formation development. *Dev Psychobiol* **27:** 367–379.
Rudy J, Cheatle M. 1977. Odor-aversion learning in neonatal rats. *Science* **198:** 845–846.
Rudy JW, Morledge P. 1994. Ontogeny of contextual fear conditioning in rats: implications for consolidation, infantile amnesia, and hippocampal system function. *Behav Neurosci* **108:** 227–234.
Rudy JW, Stadler-Morris S, Albert P. 1987. Ontogeny of spatial navigation behaviors in the rat: dissociation of "proximal"- and "distal"-cue-based behaviors. *Behav Neurosci* **101:** 62–73.
Ryan SJ, Ehrlich DE, Rainnie DG. 2014. Morphology and dendritic maturation of developing principal neurons in the rat basolateral amygdala. *Brain Struct Funct* **221:** 839–854.
Sacco T, Sacchetti B. 2010. Role of secondary sensory cortices in emotional memory storage and retrieval in rats. *Science* **329:** 649–656.
Sanchez MM. 2006. The impact of early adverse care on HPA axis development: nonhuman primate models. *Horm Behav* **50:** 623–631.
Sara SJ, Dyon-Laurent C, Hervé A. 1995. Novelty seeking behavior in the rat is dependent upon the integrity of the noradrenergic system. *Cogn Brain Res* **2:** 181–187.
Schaal B, Marlier L, Soussignan R. 1998. Olfactory function in the human fetus: evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. *Behav Neurosci* **112:** 1438–1449.
Seay B, Alexander BK, Harlow HF. 1964. Maternal behavior of socially deprived Rhesus monkeys. *J Abnorm Psychol* **69:** 345–354.
Selden NR, Robbins TW, Everitt BJ. 1990. Enhanced behavioral conditioning to context and impaired behavioral and neuroendocrine responses to conditioned stimuli following ceruleocortical noradrenergic lesions: support for an attentional hypothesis of central noradrenergic function. *J Neurosci* **10:** 531–539.
Sevelinges Y, Gervais R, Messaoudi B, Granjon L, Mouly A-M. 2004. Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learn Mem* **11:** 761–769.
Sevelinges Y, Mouly A-M, Raineki C, Moriceau S, Forest C, Sullivan RM. 2011. Adult depression-like behavior, amygdala and olfactory cortex functions are restored by odor previously paired with shock during infant's sensitive period attachment learning. *Dev Cogn Neurosci* **1:** 77–87.
Shair HN. 2014. Parental potentiation of vocalization as a marker for filial bonds in infant animals. *Dev Psychobiol* **56:** 1689–1697.
Shair HN, Masmela JR, Hofer MA. 1998. The influence of olfaction on potentiation and inhibition of ultrasonic vocalization of rat pups. *Physiol Behav* **65:** 769–772.
Shakhawat AM, Harley CW, Yuan Q. 2012. Olfactory bulb α2-adrenoceptor activation promotes rat pup odor-preference learning via a cAMP-independent mechanism. *Learn Mem* **19:** 499–502.
Shionoya K, Moriceau S, Lunday L, Miner C, Roth TL, Sullivan RM. 2006. Development switch in neural circuitry underlying odor-malaise learning. *Learn Mem* **13:** 801–808.
Shionoya K, Moriceau S, Bradstock P, Sullivan RM. 2007. Maternal attenuation of hypothalamic paraventricular nucleus norepinephrine switches avoidance learning to preference learning in preweanling rat pups. *Horm Behav* **52:** 391–400.
Shionoya K, Hegoburu C, Brown BL, Sullivan RM, Doyère V, Mouly A-M. 2013. It's time to fear! Interval timing in odor fear conditioning in rats. *Front Behav Neurosci* **7:** 128.
Shipley MT, Halloran FJ, de la Torre J. 1985. Surprisingly rich projection from locus coeruleus to the olfactory bulb in the rat. *Brain Res* **329:** 294–299.
Simola N. 2015. Rat ultrasonic vocalizations and behavioral neuropharmacology: from the screening of drugs to the study of disease. *Curr Neuropharmacol* **13:** 164–179.
Siviy SM, Harrison KA, McGregor IS. 2006. Fear, risk assessment, and playfulness in the juvenile rat. *Behav Neurosci* **120:** 49–59.
Small WS. 1899. Notes on the psychic development of the young white rat. *Am J Psychol* **11:** 80–100.
Smith JJ, Shionoya K, Sullivan RM, Wilson DA. 2009. Auditory stimulation dishabituates olfactory responses via noradrenergic cortical modulation. *Neural Plast* **2009:** 1–6.
Smotherman WP. 1982. Odor aversion learning by the rat fetus. *Physiol Behav* **29:** 769–771.
Smotherman WP, Hunt LE, McGinnis LM, Levine S. 1979. Mother-infant separation in group-living rhesus macaques: a hormonal analysis. *Dev Psychobiol* **12:** 211–217.
Sotres-Bayon F, Quirk GJ. 2010. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Curr Opin Neurobiol* **20:** 231–235.
Stanton ME. 2000. Multiple memory systems, development and conditioning. *Behav Brain Res* **110:** 25–37.
Stanton ME, Levine S. 1990. Inhibition of infant glucocorticoid stress response: specific role of maternal cues. *Dev Psychobiol* **23:** 411–426.
Stanton ME, Patterson JM, Levine S. 1985. Social influences on conditioned cortisol secretion in the squirrel monkey. *Psychoneuroendocrinology* **10:** 125–134.
Stanton ME, Wallstrom J, Levine S. 1987. Maternal contact inhibits pituitary-adrenal stress responses in preweanling rats. *Dev Psychobiol* **20:** 131–145.
Stehouwer DJ, Campbell BA. 1978. Habituation of the forelimb-withdrawal response in neonatal rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process* **4:** 104–119.
Stunden CE, Filosa JA, Garcia AJ, Dean JB, Putnam RW. 2001. Development of in vivo ventilatory and single chemosensitive neuron responses to hypercapnia in rats. *Respir Physiol* **127:** 135–155.
Suchecki D, Rosenfeld P, Levine S. 1993. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Dev Brain Res* **75:** 185–192.
Sullivan RM, Leon M. 1986. Early olfactory learning induces an enhanced olfactory bulb response in young rats. *Dev Brain Res* **27:** 278–282.
Sullivan RM, Wilson DA. 1991. Neural correlates of conditioned odor avoidance in infant rats. *Behav Neurosci* **105:** 307–312.
Sullivan RM, Wilson DA. 1993. Role of the amygdala complex in early olfactory associative learning. *Behav Neurosci* **107:** 254–263.
Sullivan RM, Wilson DA. 1995. Dissociation of behavioral and neural correlates of early associative learning. *Dev Psychobiol* **28:** 213–219.
Sullivan RM, Hofer MA, Brake SC. 1986. Olfactory-guided orientation in neonatal rats is enhanced by a conditioned change in behavioral state. *Dev Psychobiol* **19:** 615–623.

Downloaded from learnmem.cshlp.org on September 16, 2016 - Published by Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sullivan RM, Wilson DA, Leon M. 1989. Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *J Neurosci* **9:** 3998–4006.
Sullivan RM, Wilson DA, Wong R, Correa A, Leon M. 1990. Modified behavioral and olfactory bulb responses to maternal odors in preweanling rats. *Dev Brain Res* **53:** 243–247.
Sullivan RM, Taborsky-Barba S, Mendoza R, Itano A, Leon M, Cotman CW, Payne TF, Lott I. 1991. Olfactory classical conditioning in neonates. *Pediatrics* **87:** 511–518.
Sullivan RM, Zyzak DR, Skierkowski P, Wilson DA. 1992. The role of olfactory bulb norepinephrine in early olfactory learning. *Dev Brain Res* **70:** 279–282.
Sullivan RM, Wilson DA, Lemon C, Gerhardt GA. 1994. Bilateral 6-OHDA lesions of the locus coeruleus impair associative olfactory learning in newborn rats. *Brain Res* **643:** 306–309.
Sullivan RM, Landers M, Yeaman B, Wilson DA. 2000a. Neurophysiology: good memories of bad events in infancy. *Nature* **407:** 38–39.
Sullivan RM, Stackenwalt G, Nasr F, Lemon C, Wilson DA. 2000b. Association of an odor with an activation of olfactory bulb noradrenergic β-receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behav Neurosci* **114:** 957.
Suomi SJ. 1978. Maternal behavior by socially incompetent monkeys: neglect and abuse of offspring. *J Pediatr Psychol* **3:** 28–34.
Takahashi LK. 1992. Developmental expression of defensive responses during exposure to conspecific adults in preweanling rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* **106:** 69–77.
Takahashi LK. 1994a. Organizing action of corticosterone on the development of behavioral inhibition in the preweanling rat. *Dev Brain Res* **81:** 121–127.
Takahashi LK. 1994b. Stimulus control of behavioral inhibition in the preweanling rat. *Physiol Behav* **55:** 717–721.
Takahashi Y, Kiyokawa Y, Kodama Y, Arata S, Takeuchi Y, Mori Y. 2013. Olfactory signals mediate social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Behav Brain Res* **240:** 46–51.
Terranova LM, Cirulli F, Laviola G. 1999. Behavioral and hormonal effects of partner familiarity in periadolescent rat pairs upon novelty exposure. *Psychoneuroendocrinology* **24:** 639–656.
Thompson JV, Sullivan RM, Wilson DA. 2008. Developmental emergence of fear learning corresponds with changes in amygdala synaptic plasticity. *Brain Res* **1200:** 58–65.
Tottenham N, Hare TA, Casey BJ. 2011. Behavioral assessment of emotion discrimination, emotion regulation, and cognitive control in childhood, adolescence, and adulthood. *Dev Psychol* **2:** 39.
Upton KJ, Sullivan RM. 2010. Defining age limits of the sensitive period for attachment learning in rat pups. *Dev Psychobiol* **52:** 453–464.
Van Der Poel AM, Miczek KA. 1991. Long ultrasonic calls in male rats following mating, defeat and aversive stimulation: frequency modulation and bout structure. *Behaviour* **119:** 127–142.
Walker DL, Paschall GY, Davis M. 2005. Glutamate receptor antagonist infusions into the basolateral and18 medial amygdala reveal differential contributions to olfactory vs. context fear conditioning and expression. *Learn Mem* **12:** 120–129.
Wallace KJ, Rosen JB. 2001. Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear but not unconditioned fear of a predator odor: comparison with electrolytic lesions. *J Neurosci* **21:** 3619–3627.
Weldon DA, Travis ML, Kennedy DA. 1991. Posttraining D1 receptor blockade impairs odor conditioning in neonatal rats. *Behav Neurosci* **105:** 450–458.
Wiedenmayer CP. 2009. Plasticity of defensive behavior and fear in early development. *Neurosci Biobehav Rev* **33:** 432–441.
Wiedenmayer CP, Barr GA. 1998. Ontogeny of defensive behavior and analgesia in rat pups exposed to an adult male rat. *Physiol Behav* **63:** 261–269.
Wiedenmayer CP, Barr GA. 2001. Developmental changes in responsivity to threat are stimulus-specific in rats. *Dev Psychobiol* **39:** 1–7.
Wiedenmayer CP, Magarinos AM, McEwen BS, Barr GA. 2003. Mother lowers glucocorticoid levels of preweaning rats after acute threat. *Ann N Y Acad Sci* **1008:** 304–307.
Wiedenmayer CP, Magariños AM, McEwen BS, Barr GA. 2005. Age-specific threats induce CRF expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and hippocampus of young rats. *Horm Behav* **47:** 139–150.
Wilson DA, Leon M. 1988. Spatial patterns of olfactory bulb single-unit responses to learned olfactory cues in young rats. *J Neurophysiol* **59:** 1770–1782.
Wilson DA, Sullivan RM. 1990. Olfactory associative conditioning in infant rats with brain stimulation as reward. I. Neurobehavioral consequences. *Dev Brain Res* **53:** 215–221.
Wilson DA, Sullivan RM. 1992. Blockade of mitral/tufted cell habituation to odors by association with reward: a preliminary note. *Brain Res* **594:** 143–145.
Wilson DA, Sullivan RM. 2011. Cortical processing of odor objects. *Neuron* **72:** 506–519.
Wilson DA, Sullivan RM, Leon M. 1987. Single-unit analysis of postnatal olfactory learning: modified olfactory bulb output response patterns to learned attractive odors. *J Neurosci* **7:** 3154–3162.
Wöhr M, Borta A, Schwarting RKW. 2005. Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose–response study in the rat. *Neurobiol Learn Mem* **84:** 228–240.
Woo CC, Coopersmith R, Leon M. 1987. Localized changes in olfactory bulb morphology associated with early olfactory learning. *J Comp Neurol* **263:** 113–125.
Yuan Q, Harley CW, McLean JH, Knöpfel T. 2002. Optical imaging of odor preference memory in the rat olfactory bulb. *J Neurophysiol* **87:** 3156–3159.
Yuan Q, Harley CW, McLean JH. 2003. Mitral cell β1 and 5-HT2A receptor colocalization and cAMP coregulation: a new model of norepinephrine-induced learning in the olfactory bulb. *Learn Mem* **10:** 5–15.

Received March 16, 2016; accepted in revised form June 2, 2016.

Annexe 2 – Validation de la mesure semi-automatique du freezing

Une modification du système d'analyse comportementale qui a été réalisée entre l'étude de Shionoya et al (2013) et la nôtre. En effet, nous avons modifié la méthode d'encodage du freezing pour passer d'un encodage manuel, en continu pendant toute la durée de la session et dans lequel l'utilisateur connait le groupe du rat et l'arrivée de l'odeur et du choc sont signalés à l'utilisateur qui encode la vidéo, à un encodage semi-automatique dans lequel l'immobilité du rat est pré-encodée et l'utilisateur n'a qu'à déterminer si le rat est en freezing ou en immobilité calme, de manière aveugle à l'arrivée de l'odeur et du choc (mais pas au groupe expérimental) et sans nécessiter le visionnage de la vidéo en continu. Cette modification importante des conditions d'encodage du freezing a permis d'éliminer les erreurs d'encodage par l'expérimentateur dues à la fatigue et à la subjectivité inconsciente produite par la visualisation par l'expérimentateur de l'arrivée de l'odeur et du choc (voir Figure 54).

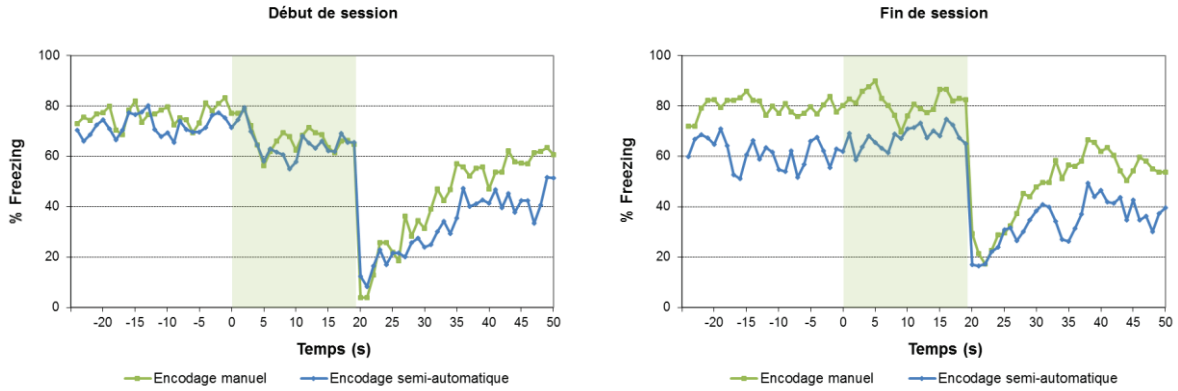


Figure 54 : Superposition des courbes de freezing obtenues avec un encodage manuel et un encodage semi-automatique sur une période allant de 25 s avant l'arrivée de l'odeur à 30 s après. La présentation de l'odeur est représentée par le rectangle vert, la fin de l'odeur signifie l'arrivée du choc. On observe une bonne superposition des courbes en début de session avant le choc. On constate une moins bonne superposition lorsque le rat récupère du choc, un effet probablement dû à la subjectivité de l'expérimentateur lors de l'encodage manuel, et vers la fin de la session, un effet probable de la fatigue de l'expérimentateur.

Réponses de peur et développement : Ontogenèse des vocalisations ultrasoniques et du décours temporel de la réponse dans un conditionnement de peur à l'odeur chez le rat

La peur est ce qui permet de réagir à un stimulus aversif par une réponse de défense adaptée à la situation. Elle peut être générée par un ensemble de stimuli naturellement aversifs ou par des stimuli ayant acquis une valeur aversive par apprentissage associatif. Cette thèse a pour but d'étudier les caractéristiques et modifications de la réponse de peur à ces deux types de stimuli au cours de l'ontogenèse. Les études présentées ici utilisent un conditionnement de peur à l'odeur chez le rat qui associe une odeur à un stimulus aversif et permet d'induire très rapidement et durablement des mémoires de peur à l'odeur. La réponse de défense peut alors être étudiée à la fois envers l'odeur apprise et envers le stimulus naturellement aversif. Nous montrons en particulier que la réponse de peur à l'odeur apprise présente un décours temporel corrélé à la durée de l'intervalle de temps entre l'odeur et le stimulus aversif, permettant d'affirmer que les animaux mémorisent et estiment le temps, et ce dès les premiers âges étudiés, avant la maturation des structures cérébrales classiquement impliquées dans cette mémoire temporelle. Par ailleurs, nous nous sommes intéressés aux vocalisations ultrasonores émises en réponse au stimulus aversif et à leur modification au cours de l'ontogenèse. Nous avons mis en évidence deux types de vocalisations chez le raton, dont les caractéristiques et critères d'induction laissent présager un rôle différentiel qui reste à explorer. L'ensemble de ces travaux soulignent que, même si les réponses de défense du rat changent au cours du développement, la capacité à produire ces réponses de manière temporellement adaptée est observée dès le plus jeune âge.

Ontogenèse, conditionnement de peur à l'odeur, réponse de défense, respiration, freezing, vocalisations ultrasonores, mémoire temporelle, striatum dorsal.

Fear responses and development: Ontogeny of ultrasonic vocalizations and temporal pattern of the response in olfactory fear conditioning in rats

Fear allows individuals to react to an aversive stimulus by a defense response adapted to the situation. It can be triggered by naturally aversive stimuli or in response to stimuli that acquired an aversive valence through associative learning. This thesis investigated the characteristics and modifications of fear responses to these two types of stimuli throughout ontogeny. The studies presented here used olfactory fear conditioning in rat, in which an odor is paired with an aversive event and allows to rapidly induce long lasting odor fear memories. Defense responses can then be studied both to the learned odor and to the naturally aversive stimulus. We showed in particular that fear response to the learned odor presents a temporal pattern correlated with the duration of the time interval between the odor and the aversive event, showing that rats can learn about time and they do so at the youngest ages studied here, before the maturation of the brain structures classically involved in interval timing. We also studied the ultrasonic vocalizations emitted in response to the aversive stimulus and their changes throughout ontogeny. We described two types of vocalizations in pups that differ in their characteristics and emission context, suggesting they could have different functions, which needs further exploration. These thesis findings highlight that although the rat's defense responses changes through ontogeny, the ability to produce temporally adapted responses occurs from the youngest age.

Ontogeny, olfactory fear conditioning, defense response, respiration, freezing, ultrasonic vocalizations, interval timing, dorsal striatum.