



HAL
open science

L'AVERSION OLFACTIVE POTENTIALISEE PAR LE GOÛT AU COURS DU VIEILLISSEMENT CHEZ LE RAT : ETUDE COMPORTEMENTALE ET IMMUNOCYTOCHIMIQUE.

David Dardou

► **To cite this version:**

David Dardou. L'AVERSION OLFACTIVE POTENTIALISEE PAR LE GOÛT AU COURS DU VIEILLISSEMENT CHEZ LE RAT : ETUDE COMPORTEMENTALE ET IMMUNOCYTOCHIMIQUE.. domain_other. Université de Bourgogne, 2007. Français. NNT : . tel-00163755

HAL Id: tel-00163755

<https://theses.hal.science/tel-00163755>

Submitted on 19 Jul 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

**Présentée devant
l'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
pour l'obtention du grade de:**

Docteur de L'Université de Bourgogne

Spécialité: Neurosciences

Par

David DARDOU

**L'AVERSION OLFACTIVE POTENTIALISEE PAR LE GOÛT
AU COURS DU VIEILLISSEMENT CHEZ LE RAT :
ETUDE COMPORTEMENTALE ET IMMUNOCYTOCHIMIQUE.**

Soutenue publiquement le 05 Juin 2007 devant la commission d'examen:

Dr. Georges Di Scala (Rapporteur)

Dr. Barbara Ferry (Membre invité)

Pr. Françoise Schenk (Rapporteur)

Pr. Simon Thornton (Président du jury)

Dr. Martine Cattarelli (Directrice de thèse)

Dr. Frédérique Datiche (CoDirectrice de thèse)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	p 1
I. Les apprentissages aversifs.	2
I.1 Les aversions conditionnées.	2
I.1.a. L'aversion gustative conditionnée.	
I.1.b. L'aversion olfactive conditionnée.	6
I.2 L'aversion olfactive potentialisée par le goût.	7
II. Les régions impliquées dans le traitement des informations olfactives et gustatives.	11
II.1. Le système olfactif du Rat.	11
II.1.a. La détection périphérique des odeurs.	11
II.1.b. Le cortex olfactif primaire.	11
II.1.c. Anatomie du cortex piriforme.	12
II.1.d. Connexions centrales du cortex piriforme.	13
II.1.e. Le cortex piriforme et la mémoire olfactive.	14
II.1.f. Un rôle du cortex piriforme dans les apprentissages aversifs?	15
II.2. Le système gustatif du Rat.	15
II.2.a. La détection périphérique du goût.	15
II.2.b. Transmission des informations gustatives des premiers relais centraux au néocortex gustatif.	16
II.2.c. Le cortex insulaire: le néocortex gustatif.	16
II.2.d. Le cortex gustative et son implication dans la mémoire gustative et l'aversion gustative conditionnée.	20
II.3. Structures cérébrales en relation avec les cortex olfactif et gustatif.	21
II.3.a. L'amygdale.	21
II.3.b. La région hippocampique.	26
II.3.c. Les aires néocorticales: cortex orbito-frontal, infralimbique et prélimbique du cortex préfrontal.	29
II.4. Conclusion.	33
III. Les gènes précoces immédiats <i>c-fos</i> et <i>zif268</i>.	34
III.1. Les gènes précoces immédiats et leurs fonctions	34
III.1.a. Nature, activation et rôle des gènes précoces immédiats.	34
III.1.b. Les gènes précoces immédiats <i>c-fos</i> et <i>zif268</i> .	36
III.2. Fos et Zif268 : des marqueurs d'activité et de plasticité ?	38
III.2.a. Fos.	38
III.2.b. Zif268.	39
IV. Impact du vieillissement sur le cerveau.	41
IV.1. Neurobiologie du vieillissement.	41
IV.1.a. Les changements morphologiques.	41
IV.1.b. Modifications des propriétés biophysiques des neurones âgés.	42

IV.1.c. Modifications des interactions cellulaires et des connexions entre les régions cérébrales.	43
IV.1.d. Impact du vieillissement sur la machinerie génique ?	44
IV.2. Modifications comportementales liées au vieillissement.	45
IV.2.a. Altérations des performances mnésiques et cognitives.	45
IV.2.b. Vieillesse et aversion : vers une amélioration des apprentissages aversifs ?	47
<u>POSITION DU PROBLEME</u>	<u>51</u>
<u>MATERIEL ET METHODE</u>	<u>55</u>
I. Animaux.	57
II. Les tests comportementaux.	59
II.1. Reconnaissance d'objet : tâche de préférence pour un nouvel objet.	61
II.1.a. Principe.	61
II.1.b. Protocole et dispositif expérimental.	61
II.1.c. Analyse.	61
II.2. La tâche de discrimination olfactive.	63
II.2.a. Principe.	63
II.2.b. Protocole.	63
II.2.c. Dispositif expérimental.	65
II.2.d. Analyse.	66
II.3. La tâche de retour au gîte.	66
II.3.a. Principe.	66
II.3.b. Protocole.	67
II.3.c. Dispositif expérimental.	69
II.3.d. Analyse.	69
III. L'aversion olfactive potentialisée par le goût.	70
IV.1. Dispositif expérimental.	70
IV.2. Protocole.	70
IV. Analyse du comportement et analyses statistiques.	75
V. Détection immunocytochimique des protéines Fos et Zif268.	77
V.1. Fixation et prélèvement du cerveau.	77
V.2. Immunohistochimie des protéines Fos et Zif268.	77
V.3. Analyse des coupes cérébrales.	79
<u>DONNEES ORIGINALES.</u>	<u>81</u>
<u>Chapitre 1:</u>	<u>83</u>
MISE AU POINT METHODOLOGIQUE: ETUDE DE DIVERS PARAMETRES EXPERIMENTAUX.	
1) Effets de la souche de rats et de la qualité des stimuli odorants.	87

- 2) **Influence du délai entre la présentation des stimuli conditionnels (odeur et goût) et le stimulus inconditionnel (LiCl): AOC ou AOPG ?** 89

Chapitre 2: 91

EFFET DE L'AGE SUR LE RAPPEL DE L'AOPG: ETUDE COMPORTEMENTALE ET NEURO-ANATOMO-FONCTIONNELLE.

I. ETUDE COMPORTEMENTALE. 93

- I.1. Analyse des capacités attentionnelles chez des rats jeunes, adultes et sénescents : tâche de reconnaissance d'objets.** 95

- I.2. Performances des rats jeunes, adultes ou sénescents soumis à l'apprentissage et au rappel d'une tâche de discrimination olfactive.** 97

- I.3. Performances des rats jeunes, adultes ou sénescents soumis à l'apprentissage et au rappel d'une tâche spatiale de retour au gîte.** 103

I.3.a. Premier apprentissage spatial. 103

I.3.b. Second apprentissage spatial. 105

I.3.c. Comparaison des performances entre le premier et le second apprentissage spatial. 108

- I.4. Performances des rats jeunes, adultes ou sénescents soumis à l'apprentissage et au rappel de l'AOPG.** 111

I.4.a. Comparaison du nombre de lapements chez les rats Li et Na. 111

I.4.b. Comparaison de la force de l'aversion selon l'âge des rats. 115

- I.5. Résumé et conclusion sur els résultats comportementaux.** 117

II. COMPARAISON DES MOTIFS D'ACTIVATION CEREBRALE EVOQUES PAR L'ODEUR OU LE GOUT LORS DU RAPPEL DE L'AOPG CHEZ DES RATS JEUNES, ADULTES OU SENESCENTS : ETUDE PAR DETECTION IMMUNOCYTOCHIMIQUE DES PROTEINES Fos ET Zif268. 121

- II.1. Etude de l'activation cérébrale induite par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG chez les jeunes rats (1,5 mois).** 125

II.1.A. Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Fos. 125

II.1.A.a. Expression de Fos chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base. 125

II.1.A.b. Comparaison de l'expression de Fos les rats Li et Na stimulés par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG. 129

II.1.B. Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Zif268. 133

II.1.B.a. Expression de Zif268 chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base. 133

II.1.B.b. Comparaison de l'expression de Zif268 les rats Li et Na stimulés par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG. 135

- II.2. Etude de l'activation cérébrale induite par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG chez les rats adultes (12-13 mois).** 141

II.2.A. Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Fos. 141

II.2.A.a.	Expression de Fos chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base.	141
II.2.A.b.	Comparaison de l'expression de Fos les rats Li et Na stimulés par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG.	143
II.2.B.	Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Zif268.	149
II.2.B.a.	Expression de Zif268 chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base.	149
II.2.B.b.	Comparaison de l'expression de Zif268 les rats Li et Na stimulés par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG.	151
II.3.	Etude de l'activation cérébrale induite par l'odeur lors du rappel de l'AOPG chez les rats sénescents (20-24 mois).	157
II.3.A.	Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Fos.	157
II.3.A.a.	Expression de Fos chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base.	157
II.3.A.b.	Comparaison de l'expression de Fos les rats Li et Na stimulés par l'odeur lors du rappel de l'AOPG.	159
II.3.B.	Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Zif268.	163
II.3.B.a.	Expression de Zif268 chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base.	163
II.3.B.b.	Comparaison de l'expression de Zif268 les rats Li et Na stimulés par l'odeur lors du rappel de l'AOPG.	165
III.	EFFET DE L'AGE SUR L'EXPRESSION DE Fos ET Zif268 LORS DU RAPPEL DE L'AOPG.	167
III.1.	Evolution de l'expression de Fos et Zif268 chez les rats contrôles de base en fonction de l'âge.	169
III.2.	Evolution en fonction de l'âge de la différence d'expression de Fos et Zif268 entre les groupes Li et Na.	170
RESUME DES RESULTATS		175
DISCUSSION		183
I.	L'AOPG : Aspects méthodologiques.	185
I.1.	Validation du protocole d'aversion olfactive potentialisée par le goût.	185
II.1.a.	AOPG versus AOC: délai entre la présentation des stimuli conditionnels et l'induction du malaise par l'injection de LiCl.	185
II.1.b.	AOPG : influence de la nature du stimulus olfactif.	186
II.1.c.	AOPG : influence de la souche de Rat.	186
II.1.d.	Le dispositif expérimental : influence possible du nombre de biberons présentés au rat lors de l'acquisition et du rappel de l'AOPG ?	187
II.1.e.	AOPG: choix du mode de stimulation pour l'odeur et le goût.	187
II.1.f.	AOPG: choix du groupe témoin.	188

I.2. Détection immunohistochimique de l'expression des protéines Fos et Zif268.	188
I.2.a. Les protéines Fos et Zif268, marqueurs d'activité et de neuroplasticité.	188
I.2.b. Expression de Fos et Zif268: choix des groupes témoins.	189
I.2.c. Influence de la durée de la stimulation.	189
I.2.d. Expression différentielle de Fos et Zif268 dans certaines régions cérébrales.	190
I.2.e. Expression de Fos et Zif268 et substrat neuronal sous-tendant le rappel de l'AOPG.	191
II. Impact du vieillissement sur les capacités cognitives du Rat.	192
II.1. Influence de l'âge sur la reconnaissance d'objets : étude de la mémoire à court-terme.	192
II.2. Influence de l'âge sur une discrimination olfactive: acquisition, mémoire à long-terme et rappel.	193
II.3. Influence de l'âge sur la mémoire spatiale (tâche de retour au gîte) acquisition, mémoire à long-terme et rappel.	194
II.4. Vieillesse et capacités cognitives chez le Rat.	196
III. L'acquisition et le rappel de l'AOPG sont-ils modifiés en fonction de l'âge ?	198
IV. Impact du vieillissement et de la nature du stimulus (odeur ou goût) sur les réseaux sous-tendant le rappel de l'AOPG.	200
IV.1. Effet de l'âge sur l'expression basale de Fos et de Zif268.	200
IV.2. Effet de l'âge et du stimulus conditionnel présenté lors du rappel de l'AOPG sur l'expression de Fos et de Zif268.	201
IV.2.a. Régions cérébrales activées uniquement lorsque l'odeur est utilisée pour le rappel de l'AOPG.	201
IV.2.b. Régions cérébrales activées par l'odeur et par le goût lors du rappel de l'AOPG.	204
V. Vers un modèle de réseau sou-tendant le rappel de l'AOPG.	211
V.1. Le sous-réseau « sensoriel ».	211
V.2. Le sous-réseau « fonctionnel » : intégration des stimuli et l'élaboration de la réponse aversive.	212
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.</u>	<u>215</u>
<u>REFERENCES</u>	<u>217</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>241</u>

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

AGC : Aversion Gustative conditionnée

AI : région Agranulaire du cortex Insulaire

AMYG : amygdale

AOC : Aversion Olfactive Conditionnée

AOPG : Aversion Olfactive Potentialisée
par le Goût

BLA : noyau Basolatéral de l'amygdale

BO : Bulbe Olfactif

CA1 : Cornes d'Ammon 1 ou champ CA1
de l'hippocampe

CA3 : Cornes d'Ammon 3 ou champ CA3
de l'hippocampe

Ce : noyau Central de l'amygdale

CE : Cortex Entorhinal

CI : Cortex Insulaire

COF : Cortex Orbito-Frontal

CP : Cortex Piriforme

CPa : Cortex Piriforme antérieur

CPp : Cortex Piriforme postérieur

CPFm : Cortex PréFrontal médian

DI : région Dysgranulaire du cortex
Insulaire

GD : Gyrus Denté de l'hippocampe

GI : région Granulaire du cortex Insulaire

GPIs : gènes précoces immédiats

Hipp : Hippocampe

IL : cortex InfraLimbique

IS : Intervalle entre les Stimulation

LiCL : Chlorure de lithium

Med : noyau Médian de l'amygdale

NaCl : Chlorure de Sodium

NTS : Noyau du Tractus Solitaire

PbN : Noyau Parabrachial

PL : cortex Prélimbique

PLT : Potentialisation à Long-Terme

PNO : Préférence pour un Nouvel Objet

SC : Stimulus Conditionnel

SI : Stimulus Inconditionnel

TDO : Tâche de Discrimination Olfactive

TRGi : Tâche de Retour au Gîte

VPMpc : région parvo-cellulaire de la
partie médiane du noyau
ventropostéromédian du thalamus

REMERCIEMENTS

Alice poussa un soupir de lassitude.

« Je crois que vous pourriez mieux employer votre temps, déclara-t-elle, que de le perdre à poser des devinettes dont vous ignorez la réponse. »

Alice au pays des Merveilles,

Chapitre 7

Il est toujours difficile de commencer des remerciements, surtout lorsqu'il s'agit de conclure cette formidable aventure qu'a été ce travail de thèse.

Je tiens donc à remercier le professeur SCHENK et le docteur DI SCALA qui malgré des emplois du temps très chargés ont bien voulu être les rapporteurs de ce travail de thèse. Je les remercie également pour s'être déplacés, malgré la distance, à Dijon et d'avoir participé au jury lors de la soutenance de ce travail, ce fut pour moi un honneur et un plaisir.

Je voudrais également remercier le professeur THORTON, qui malgré ces nombreuses obligations, m'a fait l'honneur d'être le président de mon jury de soutenance.

Je voudrais également exprimer tout ma gratitude au docteur FERRY pour avoir suivi ce travail de thèse et pour sa participation au jury.

Je voudrais remercier les personnes qui m'ont donné le « goût » de la recherche et qui, sans elles, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie donc le docteur Frédérique DATICHE qui a co-encadré mon DEA puis ce travail de thèse. Sa présence sur le terrain aussi bien pendant l'élaboration et la réalisation des expérimentations, ainsi que ces commentaires et les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir m'ont beaucoup aidé pour mener cette thèse à son terme.

Je voudrais également chaleureusement remercier le docteur Martine CATTARELLI pour la confiance qu'elle m'a accordée en m'acceptant au sein de son laboratoire en DEA, puis en thèse. Malgré, la distance, a toujours su diriger ce travail et l'enrichir de ses commentaires et questionnements.

Merci aussi au docteur Fabienne LIENNARD qui, bien que restant dans l'ombre, a toujours été là pour donner un petit coup de pouce salvateur lors des grosses expérimentations ou donner des pistes toujours intéressantes.

Un GROS MERCI également à mes collègues et amis doctorants du CESG et de l'UB, merci à Julie MILLERY, Stéphanie VELOSO, Delphine BRAJON, Jennifer LANGLOIS, Fabienne LAUGERETTE, Mariam RALIOU, Nicolas PINEAU, Arnaud GAUDIN, Jeremy SKRYPZKI, Edgar GERVASIO et Eric TELLIER. Nos discussions, ainsi que votre bonne humeur, ont également grandement participé au fait que ce travail soit arrivé à son terme.

Je voudrais également remercier chaleureusement les nombreuses personnes, qui, au CESG ont participé de près ou de loin à ce travail de thèse. Merci donc aux docteurs Jean-Pierre Montmayer, Ingrid Jacob. Un grand merci également à Olivier Bernardini (pour tous le soin qu'il apporte tous les jours à nos animaux et surtout à mes « petits vieux »), Sylvie Graal, Michel Tazvan (créateur de nos lickomètres et des appareils utilisés pour l'étude comportementale), Mathieu Rossé (qui a donné vie au lickomètres), Cedric Serrano (bonne humeur et toujours disponible pour donner un coup de main) et Francis Leger (grand maître d'Internet).

Merci également aux amis de la région d'Auxerre qui, malgré la distance ou des emplois du temps chargé, ont toujours eut un moment pour discuter ou pour se retrouver autour d'un verre... Votre soutien a toujours été pour moi important. Merci donc à Antoine, Romu, Julie & Math, à notre grosse loutre bretonne (JL pour les intimes) et aussi à Fred (qui m'a poussé dans cette voie longue et sinueuse mais oh combien enrichissante).

Je terminerais par remercier ma famille et mes parents qui m'ont toujours soutenue, même dans les moments les plus difficiles.

∞INTRODUCTION∞

I- Les apprentissages aversifs

Dans ses travaux, qui sont à la base des recherches sur les apprentissages associatifs, Pavlov (1927) avait noté que la présentation d'un stimulus suivie par une récompense entraînait une réponse conditionnée envers ce stimulus quand il était représenté seul à l'animal. Pour Pavlov, c'est la contiguïté entre la présentation du stimulus conditionnel et inconditionnel qui engendrait une association entre les deux phénomènes. Richter en 1945, observa de nouveau cette capacité à associer deux stimuli mais, cette fois-ci, il s'agissait d'associer nourriture et malaise. En effet, en cherchant un moyen efficace pour se débarrasser des rats, il observa que, si la consommation d'un appât empoisonné n'entraînait pas la mort de l'animal, ce dernier évitait ensuite de re-consommer l'appât. Pour Richter, chimiste de formation, tout se passe comme si le rat avait appris que la consommation de l'appât pouvait nuire à sa survie et que, pour se protéger, l'animal avait associé appât et malaise. C'est après les publications de Garcia, dans les années 1950-60, qu'un véritable intérêt pour le phénomène d'aversion alimentaire apparut.

Des premières observations sur l'aversion alimentaire découlèrent de nombreuses recherches visant à recréer cet apprentissage en laboratoire. Ces travaux ont conduit à distinguer l'aversion gustative conditionnée (AGC) et l'aversion olfactive conditionnée (AOC).

I.1. Les aversions conditionnées.

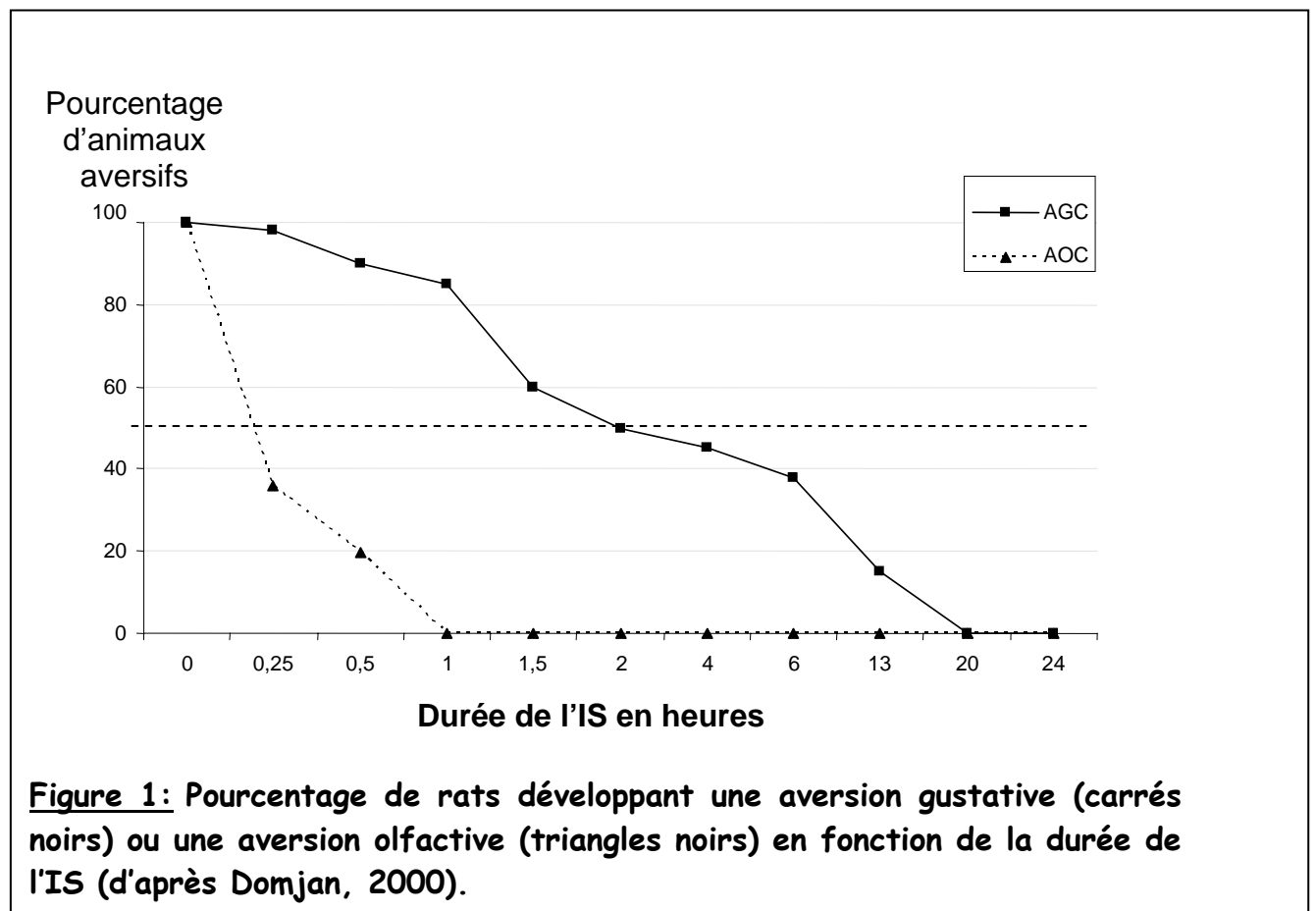
I.1.a. L'aversion gustative conditionnée.

De leurs premiers travaux sur les effets d'une exposition aux rayonnements Gamma sur la consommation hydrique des rats, Garcia et ses collègues concluent à l'existence d'un nouveau type d'apprentissage : l'aversion gustative (Garcia et al. 1955, 1956 et 1966). Cet apprentissage, tel qu'il fut décrit, remettait en question plusieurs théories sur l'apprentissage. En effet, l'aversion gustative conditionnée (AGC) se base sur trois grands principes:

- une association sélective, c'est-à-dire que le goût s'associe plus facilement avec un malaise que d'autres stimuli tel que des signaux visuels ou auditifs (Garcia et Koelling, 1966). Ces auteurs testent la réponse des animaux aux conditionnements

suivants : un stimulus conditionnel (SC), goût ou signal audiovisuel, est associé avec un stimulus inconditionnel (SI), choc électrique ou malaise gastro-intestinal. Ils observent que seuls les animaux soumis à l'association goût-malaise gastrique expriment une aversion pour le goût.

- un apprentissage fort et persistant, puisqu'une seule présentation du goût suivi d'un malaise suffit pour induire une aversion très marquée pour ce stimulus. De plus, il faut de nombreuses présentations du goût sans effet viscéral ultérieur pour que les animaux le ré-acceptent. De même, chez l'Homme, ce comportement aversif peut persister de la petite enfance jusqu'à plus de cinquante ans (Chambers et Bernstein 2003).



- l'apprentissage a lieu même si un délai de plusieurs heures sépare la présentation du goût de l'induction du malaise (Garcia et Koelling 1966 ; Domjan 2000) (Figure 1). Bien que les deux premiers points soient maintenant bien acceptés

par les spécialistes du comportement, l'apprentissage de l'AGC se distingue de l'apprentissage pavlovien ou apprentissage associatif classique (Bernstein 1991 ; Holland 2006) par le fait qu'il peut se mettre en place même avec un long délai entre SC et SI (Garcia et Koelling 1966 ; Hankins et al. 1973 ; Rusiniak et al. 1979 ; Palmerino et al. 1980 ; Ferry et al. 1996). Dans les apprentissages classiques, l'intervalle entre les stimuli (IS) doit, en général, être très court pour que l'association entre SC et SI soit optimale. Or, même lorsque l'IS atteint 1h, la majorité des animaux expriment encore l'AGC. Cette propriété conduit de nombreux chercheurs à considérer, parmi les conditionnements classiques, l'AGC comme un cas particulier : apprentissage dit « de trace ». Par exemple, l'eau sucrée, en tant que SC, laisserait une trace à la fois physiologique, due à la digestion, et mnésique qui se dissipe lentement et reste capable d'être associée avec un SI dans le cadre d'un mécanisme de défense interne contre l'empoisonnement éventuel qui pourrait résulter de la consommation d'un nouvel aliment (Garcia et al. 1968).

Actuellement, à partir de ces caractéristiques, on définit l'AGC comme un apprentissage de type pavlovien dans lequel le goût d'une nouvelle nourriture sert de SC et le malaise gastro-intestinal, de SI (Domjan 2000).

Sur le plan expérimental, c'est l'injection d'une dose de chlorure de lithium (LiCl) qui est le SI le plus utilisé pour induire une AGC. En effet, une injection intra-péritonéale de LiCl déclenche rapidement (quelques minutes après l'injection) un malaise viscéral en créant une irritation (de quelques heures) de la sphère gastro-intestinale qui mime les troubles digestifs liés à une intoxication. Toutefois, d'autres types de SI ont aussi été utilisés comme par exemple, les rayonnements Gamma (Garcia et al. 1956) ou l'injection d'apomorphine (Garcia et Koelling 1966).

L'AGC a été observée chez les petits Mammifères tel que le Rat, la Souris et le Hamster (Nowlis et al. 1980), mais aussi chez des espèces plus évoluées comme le Chat, le Renard (Palmerino et al. 1980), le Loup et même chez l'Homme (Bernstein 1999). Le fait que l'AGC se retrouve chez quasiment toutes les espèces montre que cet apprentissage joue un rôle prépondérant dans la protection contre les intoxications possibles et donc dans l'établissement de nos choix alimentaires.

I.1.b. L'aversion olfactive conditionnée.

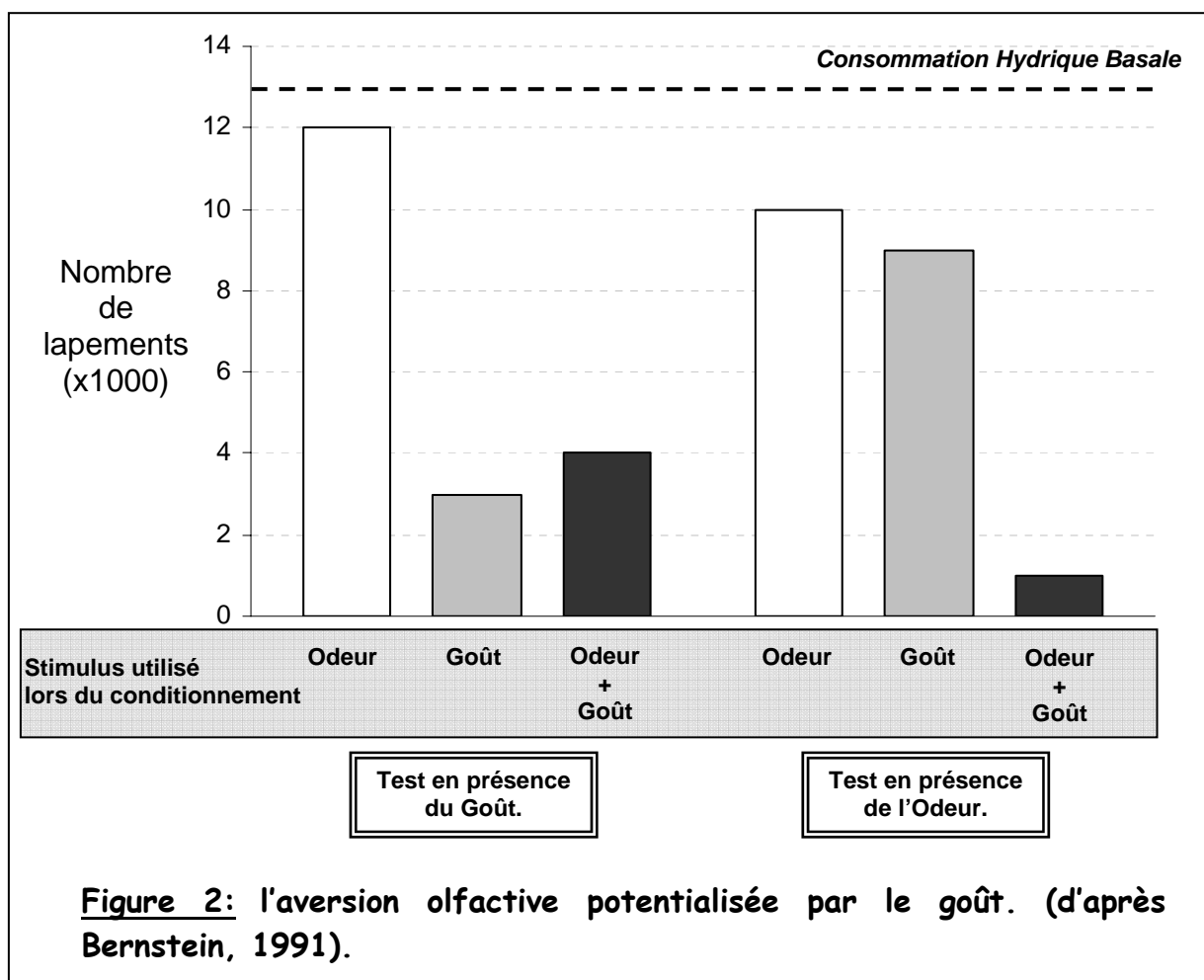
Les signaux olfactifs jouent un rôle important dans les choix alimentaires (LeMagnen, 1959) et des aversions olfactives conditionnées (AOC) peuvent parfois apparaître. Toutefois, si l'AGC est un apprentissage rapide et robuste, l'AOC est plus difficile à établir. En effet, la consommation d'un aliment, insipide mais odorisé, couplée à l'induction d'un malaise gastro-intestinal conduit à l'établissement d'une AOC seulement si l'IS est très court. Comme le montre la figure 1, lorsque l'IS dépasse 30 min, 20% seulement des rats conditionnés deviennent aversifs (Hankins et al. 1973 ; Rusiniak et al. 1979 ; Palmerino et al. 1980 ; Ferry et al. 1996). Pour induire l'AOC, plusieurs composés ont été utilisés comme SI, de l'injection de chlorure de lithium (LiCl) (Palmerino et al. 1980) à celle de d-amphétamine (Bryant et al. 1993).

Bien que l'AOC puisse être obtenue avec différentes odeurs, il semble que, comme pour l'AGC, le SC olfactif doit être nouveau et bien localisé dans l'espace. En effet, si les animaux ont déjà rencontré une odeur, il semble plus difficile de l'utiliser pour établir une AOC. De même, si l'odeur n'est pas proche de la source alimentaire mais diffuse dans l'environnement, les animaux ne peuvent acquérir une aversion pour ce stimulus (Bouton et al. 1986). Ainsi, l'odeur constitue, pour les animaux, un stimulus difficile à associer avec un malaise viscéral. Par contre, un tel stimulus est très facilement associé à un choc électrique, ce qui conduit, par la suite, les sujets à l'éviter (Rusiniak et al. 1982).

L'AOC et l'AGC seraient les bases d'un système de défense qui permettrait aux animaux de détecter (de façon distale ou proximale), d'accepter ou de rejeter un aliment sur la base de son expérience passée (Garcia et Ervin, 1968). Les observations en laboratoire montrent que l'AGC est facilement inductible, robuste et tolère un long IS. En revanche, l'AOC est difficilement inductible car ne supportant pas de longs IS. Ce dernier point est en contradiction avec ce que l'on peut observer dans le milieu naturel. En effet, les animaux semblent capables d'apprendre à éviter un aliment toxique en se basant uniquement sur l'odeur et cela, même avec une seule présentation et/ou un long délai entre *les* stimulations. Ainsi, il semble que l'AOC et l'AGC ne rendent pas compte à elles seules des phénomènes aversifs observables dans la nature et qu'il existe un mécanisme de défense supplémentaire. Celui-ci faciliterait, chez les animaux, le développement d'une aversion olfactive lorsque celle-ci est potentialisée par l'apprentissage simultané d'une AGC. Ce processus a été décrit et caractérisé il y a environ un quart de siècle. Il s'agit de l'aversion olfactive potentialisée par le goût ou AOPG (Rusiniak et al. 1979 ; Durlach et Rescorla 1980 ; Palmerino et al. 1980).

I.2. L'aversion olfactive potentialisée par le goût.

Dans leur environnement naturel, des coyotes, rendus malade par la consommation de carcasses de proies contaminées par du LiCl, évitent ensuite les proies vivantes comme si leur seule odeur réactivait l'aversion acquise (Palmerino et al. 1980). C'est sur la base de telles observations que Rusiniak et al. (1979) démontrent, en laboratoire, le phénomène d'AOPG. Comme le montre la figure 2, la présentation simultanée de l'odeur et du goût permet de potentialiser l'AOC. Cette potentialisation permet alors aux animaux d'acquérir une AOC même s'il existe un délai entre le SC et le SI (Bernstein 1991, 1999).



L'AOPG est un cas à part parmi les apprentissages associatifs. Normalement, lors de la présentation simultanée de deux stimuli de modalités sensorielles différentes, si l'un de ces composés est plus pertinent, il en résulte un masquage ou « overshadowing ». Ainsi, si le goût (stimulus très saillant) est présenté avec une odeur, il devrait en résulter un masquage de

l'AOC par l'AGC. Or, dans l'AOPG, l'aversion pour l'odeur n'est pas masquée mais, au contraire, potentialisée par la présentation du goût (Rusiniak et al. 1982a, b).

Comme pour l'AGC, plusieurs IS ont été testés. Les principales études sur l'AOPG sont résumées dans le tableau 1 (A et B). On voit que, même avec un IS de 4h, on observe une AOPG ainsi qu'une AGC. En outre, de nombreux travaux ont cherché à déterminer la façon optimale de délivrer le SC (c'est-à-dire l'odeur et le goût). Le tableau 1A montre que la présentation conjointe des stimuli olfactif et gustatif de façon à créer une saveur (c'est-à-dire en diluant un composé odorant dans une boisson ayant une saveur déterminée) permet d'obtenir une AOPG. Le tableau 1B indique que l'on peut également séparer les signaux gustatif et olfactif (par exemple, en plaçant un tampon odorisé à proximité de l'embout du biberon contenant une solution de saveur bien définie) (Palmerino et al. 1980) et que l'on obtient aussi une AOPG. Néanmoins, lorsque les stimuli sont distincts, il faut que leurs présentations soient simultanées et localisées dans le même espace (Coburn et al. 1984 ; Holder et Garcia 1987, Batsell et Batson 1999).

Malgré les nombreux travaux qui se sont focalisés sur l'AOPG, les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène restent encore peu compris. Garcia et al. (1989) propose un modèle pour en rendre compte: la théorie de la porte sensorielle ou « sensory gate ». Cette hypothèse stipule que, lors de l'ingestion d'un nouvel aliment, l'association des signaux distaux (l'olfaction) avec le goût facilite l'intégration de l'odeur dans le système de défense interne. Cette facilitation serait due à une « porte sensorielle » qui permettrait au système de défense interne d'influencer celui de défense externe. Durlarch et Rescorla (1980) proposent une autre hypothèse selon laquelle la potentialisation créerait une association entre les stimuli olfactif et gustatif. Ainsi, lors du rappel de l'AOPG, la présentation de l'odeur réactiverait la représentation odeur-goût stockée dans le cerveau des animaux. C'est la réactivation de cette trace liée au souvenir du SI qui pourrait conduire à l'expression de l'aversion, qu'elle soit olfactive ou gustative. Cette hypothèse a été reformulée (Kucharski et Spear, 1985) en introduisant le terme de « *saillance* ». Pour ces auteurs, la potentialisation permettrait l'intégration de l'odeur et du goût en une unité très saillante; lors du test, les animaux

A	SC		SI	IS (min)	AOPG	
	Références	qualité			Durée de la stimulation	Aversion odeur
Rusiniak et al. 1979	Amande + Saccharine	15 min	LiCl (0.15M; 10ml/kg) Administration intra gastrique	30	Oui	Oui
Durlach & Rescola 1980	Amande ou Banane + Saccharine ou NaCl	10 min	2 x LiCl (0.6M; 5ml/kg) i.p.	15	Oui	Oui
Miller et al. 1986	Amande + Saccharine	15 min	3x Morphine (0.3M; 10ml/kg) Sous cutanée	0	Oui	Oui
Bouton et al. 1986	Amande + Saccharine	10 min	2 x LiCl (0.3M; 5ml/kg) i.p.	30	Non	Non testé
Bryant et al. 1993	Amande + Saccharine	15 min	LiCl (0.3M; 5ml/kg) i.p.	0	Oui	Oui
			Amphétamine (1ml/kg) i.p.	0	Oui	Oui
Inui et al. 2006	Banane + Saccharine	2 essais de 3 min	LiCl (0.15M; 20mL/kg) i.p.	30	Oui	Oui

B

Palmerino et al. 1980	Amande + Saccharine	10 min	LiCl (0,15M; 30 ml/kg) Administration gastrique	5, 15, 30, 2h et 4h	Oui	Oui
				6h et 20h	Non	Non
Rusiniak et al. 1982	Amande + Saccharine	5 min	2x LiCl (0,15M; 30 ml/kg) Administration gastrique 5x LiCl (0,15M; 20 ml/kg) Administration gastrique	15	Oui	Oui
				30	Oui	Oui
Lasiter et al. 1984	Amande + Saccharine	5 min	LiCl (150mM; 193mg/kg) Administration gastrique	30	Oui	Oui
Bouton et al. 1986 (*)	Amande + Saccharine	10 min	LiCl (0,3M; 5ml/kg) i.p.	30	Oui	Non testé
Holder et Garcia 1987	Amande + Saccharine	15 min	LiCl (0,3M; 1,6 ml/kg) Administration gastrique	30	Oui	Oui
Schneider et Pinnow 1994	Amande + Saccharine ou Abricot +NaCl	5 min	2x LiCl (0,015M; 31,7 ml/kg) i.p.	0	Oui	Oui
Hatfield et al. 1992	Amande + Saccharine	5 min	LiCl (0.3 M; 75mg/kg) i.p.	30	Oui	Oui
Paradis et Cabanac 2004	Nourriture	1 h	LiCl (0.15M, 190mg/kg) i.p.	30	Oui	Oui
Ferry et al. 1997	Amande + Saccharine	10 min	LiCl (0.15M; 10ml/kg) i.p.	30	Oui	Oui
Inui et al. 2006	Banane + Saccharine	2 essais de 3 min	LiCl (0.15M; 20mL/kg) i.p.	30	Oui	Oui

Tableau 1: Illustration de différentes conditions expérimentales utilisées pour induire l'AOPG.

Le tableau A résume les expérimentations mélangeant l'odeur et le goût, et le tableau B celles séparant les deux stimulations (adaptée et complétée à partir de la thèse de B. Ferry, 1997).

réagissent aux stimuli conditionnés comme s'ils répondaient au stimulus le plus pertinent. Ces hypothèses sous-entendent que l'AOPG dépend de la capacité des animaux à établir une AGC. Ainsi, l'extinction de l'AGC, par répétition de la présentation du goût non suivie par le SI, fait également disparaître l'aversion vis-à-vis de l'odeur (Durlarch et Rescorla 1980 ; Miller et al. 1986, Batsell et Batson 1999). Mais ces observations restent controversées car, en utilisant des procédures similaires ou en pré-exposant le sujet au goût (ce qui permet d'affaiblir l'AGC), d'autres auteurs observent que les animaux restent capables d'acquérir une AOPG (Holder et Garcia 1987 ; Bryant et al. 1993). Ainsi, même si ces hypothèses, élégantes, ne sont pas vérifiées, elles constituent néanmoins un pas essentiel pour avancer dans la compréhension de l'AOPG et du phénomène de la potentialisation.

Même si la majorité des études sur l'AOPG utilise le Rat comme modèle, ce conditionnement peut être acquis par les Reptiles (Paradis et Cabanac 2004), le Hamster doré (Lichenstein et Cassini 2001), le bétail (Ralph et Cheney 1993) et aussi par l'Homme (Smith et al. 1984 ; Bernstein 1999, Chambers et Bernstein 2003). On peut aussi noter que la potentialisation par le goût peut s'étendre à des stimuli autres qu'olfactifs : chez le Pigeon, la présentation simultanée d'un goût avec une solution colorée entraîne une aversion potentialisée pour cette dernière (Clarke et al. 1979).

En conclusion, il apparaît que de nombreuses espèces animales sont capables de se protéger des conséquences nocives dues à la consommation d'un aliment nouveau en activant des mécanismes de défenses externes (l'AOC) et internes (l'AGC). Alors que, l'apprentissage de l'AGC est robuste et autorise un IS relativement long, l'induction du malaise viscéral doit être très rapide pour obtenir une AOC. Dans l'AOPG, la présentation du goût simultanément à celle de l'odeur, permet l'établissement d'une aversion olfactive avec un IS plus long. Bien que les mécanismes neurobiologiques de l'AOPG restent encore mal élucidés, cet apprentissage représente un bon modèle pour l'analyse des interactions entre modalités olfactive et gustative dans le cadre du comportement alimentaire.

Dans le chapitre suivant nous allons présenter les structures cérébrales jouant un rôle dans le traitement de ses deux modalités et nous soulignerons leurs implications, connues à ce jour, dans les phénomènes d'aversion alimentaire.

II- Les régions cérébrales impliquées dans le traitement des informations olfactive et gustative.

II.1. Le système olfactif du Rat.

Le Rat est un animal dit macrosmate car il possède de très bonnes capacités de détection des molécules volatiles. L'olfaction est le système sensoriel le plus développé chez cette espèce, elle lui permet de repérer sur de grandes distances sa nourriture ou ses prédateurs. Ainsi, l'olfaction est un sens primordial pour la survie de l'animal dans son habitat naturel. Ces fonctions sont possibles grâce à un système de détection périphérique performant et une architecture cérébrale particulière.

II.1.a. La détection périphérique des odeurs.

C'est au niveau de la muqueuse olfactive, située dans la cavité nasale, que sont détectées les odeurs. Les molécules odorantes sont captées par des neurones portant à leur apex des récepteurs moléculaires. Ces récepteurs ont été caractérisés par Buck et Axel en 1991 chez la Souris. L'arrivée d'une molécule odorante à leur niveau active une cascade biochimique qui conduit à la dépolarisation du neurorécepteur. Celui-ci, via son axone, envoie des influx aux neurones localisés dans le bulbe olfactif (BO). Ceux-ci sont rassemblés en unités fonctionnelles appelées glomérules où se fait le premier relais synaptique de l'information olfactive.

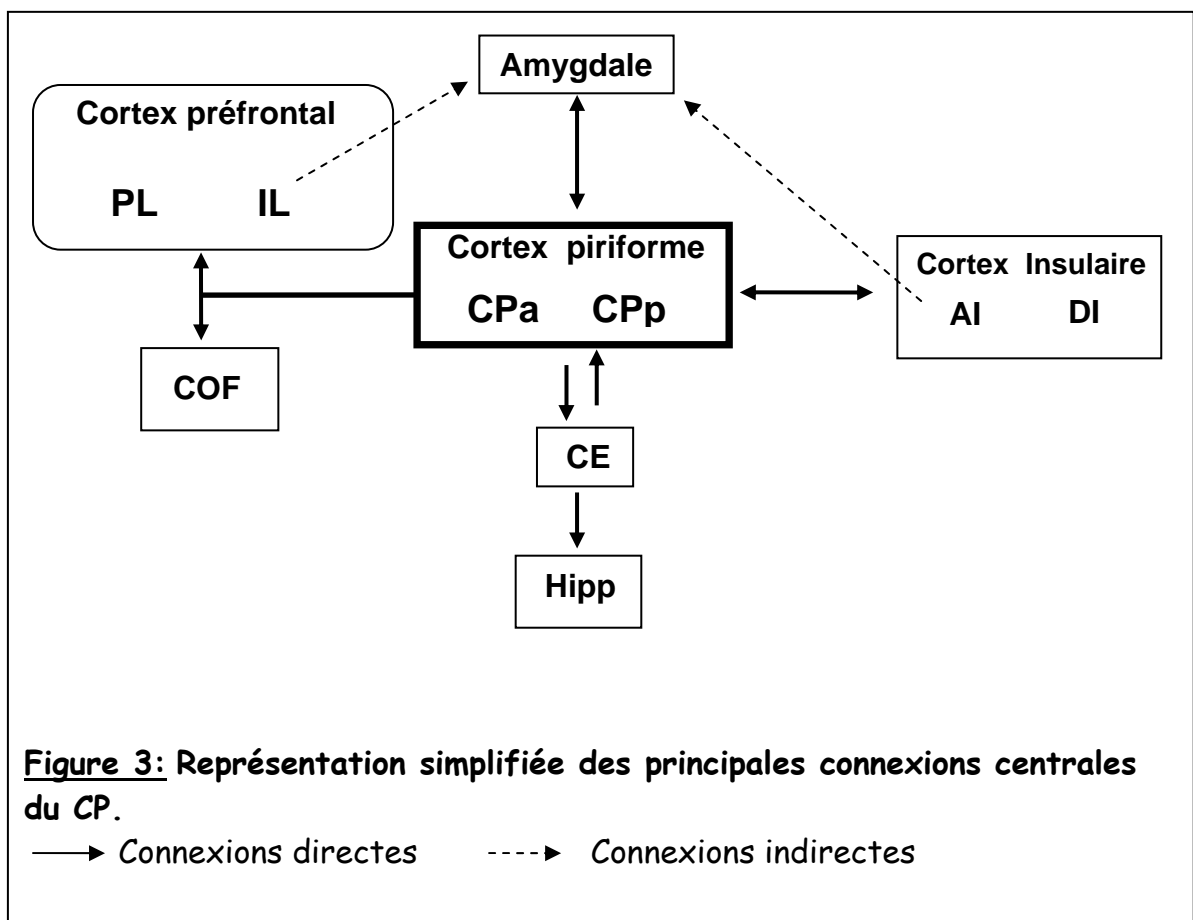
A sa sortie du BO, elle est envoyée vers le cortex olfactif primaire qui va la traiter et la re-distribuer à d'autres régions du cerveau. Cette architecture permet à l'information olfactive de passer rapidement du niveau périphérique au niveau central sans relais thalamique, ce qui différencie le système olfactif des autres systèmes sensoriels.

II.1.b. Le cortex olfactif primaire.

Les axones des deutoneurones bulbaires se rassemblent et constituent le tractus olfactif latéral qui se projette massivement sur plusieurs structures cérébrales : le noyau olfactif

antérieur, la partie ventrale de la *taenia tecta*, le noyau du tractus olfactif latéral, le cortex piriforme (CP), le cortex entorhinal (CE) et sur les noyaux antérieur et postéro-latéral de l'amygdale (Price, 1973 ; Haberly et Price, 1978 ; Haberly, 1985). Ces structures vont permettre de traiter l'information olfactive mais aussi de l'intégrer avec d'autres, comme des informations émotionnelles (via l'amygdale) ou déjà mémorisées (via le cortex entorhinal) (voir figure 3).

Parmi les structures constituant le cortex olfactif primaire, le CP reçoit la plus grande partie des afférences bulbaires.



II.1.c. Anatomie du cortex piriforme.

Situé en position ventro-latérale dans l'encéphale, le CP est délimité à l'avant par le noyau olfactif antérieur, à l'arrière par le CE, et, dans le sens dorso-ventral, respectivement par le sulcus rhinal, le tractus olfactif latéral et le cortex amygdalien (Haberly, 1985). Il s'étend sur environ 7mm de longueur et est divisé, au passage de l'artère médiane télencéphalique, en deux subdivisions, une antérieure (CPa) et une postérieure (CPp). Le CP

est constitué de trois couches de cellules (Haberly et Price, 1978) interconnectées par un réseau dense de fibres intrinsèques d'association qui permet une redistribution antéro-postérieure de l'information (Haberly et Bower, 1989). Ces caractéristiques ont permis d'émettre l'hypothèse que le cortex olfactif primaire fonctionnerait comme une mémoire associative (Haberly, 1985) qui permettrait de comparer un stimulus odorant présent aux traces mnésiques résultant d'expériences olfactives passées (Hasselmo et al., 1995 ; Haberly, 2001). Les subdivisions antérieure et postérieure diffèrent au niveau de leurs critères histologiques et de leurs connexions. En effet, le CPa reçoit la majorité des afférences provenant du tractus olfactif latéral et du noyau olfactif antérieur (Haberly, 2001). De plus, il est principalement connecté aux aires néocorticales frontales ventro-latérale et latérales (Datiche et Cattarelli, 1996). En revanche, le CPp reçoit moins d'afférences en provenance du tractus olfactif latéral. Il en reçoit cependant du noyau olfactif antérieur et de la *taenia tecta* ventrale (Haberly, 2001). Il est aussi la principale cible des projections du noyau endopiriforme. Enfin, le CPp est en relation avec la région agrulaire du cortex insulaire (Datiche et Cattarelli, 1996).

II.1.d. Connexions centrales du cortex piriforme.

Le CP est intimement connecté aux autres régions qui composent le cortex olfactif primaire (Haberly et Price, 1978). De plus, il est en relation directe ou indirecte avec de nombreuses structures centrales impliquées dans différents phénomènes tels que l'émotion ou la mémoire (voir figure 3).

Les premières études de traçage par autoradiographie ont montré que les noyaux amygdaliens reçoivent des projections provenant du BO mais aussi du CP (figure 3) (Price 1973). Ce dernier projette sur la subdivision antérieure du noyau cortical, le noyau basal accessoire, le noyau basolatéral (BLA), le noyau médian (Med) et le noyau central (Ce) (Luskin et Price, 1983 ; Mc Donald, 1998 ; Pitkanen, 2000; Sah et al. 2003). Outre ces projections directes, le CP établit aussi des relations indirectes avec l'amygdale via le cortex infralimbique (IL) et la région ventrale du cortex agrulaire insulaire (AI) (Luskin et Price, 1983).

La partie postérieure du CP envoie des collatérales d'axones vers le CE (Haberly et Price, 1978 ; Witter et al. 1989) qui se projette, en retour en partie sur le CP, ainsi que sur le gyrus denté (GD) (Haberly et Price, 1978). Ainsi, le GD, relais entre le CP et l'hippocampe

(Vanderwolf, 2001), constitue la principale voie d'entrée des informations olfactives vers la formation hippocampique (Witter et al. 1989).

Enfin, le CP est en relation avec les aires néocorticales frontales. En effet, il envoie de nombreuses et denses arborisations d'axones en direction des régions préfrontales et celles-ci se projettent en retour massivement vers le CP (Johnson et al. 2000). En particulier, ce cortex olfactif est en relation avec les régions situées dans la partie latérale du cortex frontal: les aires orbito-frontale latérale et ventro-latérale (Price, 1985). Par traçage rétro- et antérograde à l'aide de la toxine cholérique, Datiche et Cattarelli (1996) ont précisé l'organisation des connexions entre le CP et des aires du cortex orbito-frontal (COF) et mis en évidence leur organisation topographique: c'est principalement le CPa qui est en relation avec la région ventro-latérale. De plus, le CP est également connecté avec la région postérieure de l'AI (Price, 1985 ; Datiche et Cattarelli, 1996). Enfin, le CP reçoit des projections en provenance des régions frontales infra- et prélimbique (PL) (Sesack et al. 1989).

II.1.e. Le cortex piriforme et la mémoire olfactive.

De par sa place dans le cortex olfactif primaire, ses connexions et sa structure histologique, le CP semble jouer un rôle important dans la mémorisation des odeurs. Des lésions partielles du CP réduisent la capacité des animaux à acquérir une tâche de discrimination olfactive impliquant des composés odorants complexes (Staubli et al. 1987). Néanmoins, à ce jour le rôle précis du CP dans la mémoire olfactive reste encore mal défini.

Dans le CP, le phénomène de potentialisation à long terme ait été démontré *in vitro* (Jung et Larson, 1994), et cette région est le siège d'une potentialisation synaptique lors d'un apprentissage associatif entre un stimulus et une récompense (Roman et al. 1987 ; Chaillan et al. 1996). De même, chez le rat anesthésié, en enregistrant l'activité nerveuse à l'aide de colorant potentiel-dépendant suite à un conditionnement olfacto-mimétique, Litaudon et al. (1997) montrent que les réponses du CP sont durablement modifiées. En stimulant électriquement le BO, Mouly et Gervais (2002) observent aussi que la composante polysynaptique tardive des potentiels évoqués est modifiée dans le Cpp et le CE. D'autre part, la morphologie et la physiologie des neurones pyramidaux du CP changent après un apprentissage olfactif (Roman et al. 1987, Saar et al. 1999, Knafo et al. 2001, 2005). Des travaux utilisant la détection immunocytochimique de la protéine Fos montrent que la vitesse d'apprentissage d'une tâche de discrimination olfactive modifie l'expression de cette dernière dans le CP (Datiche et al. 2001). D'autre part, le nombre de cellules immunoréactives est

augmenté dans le CPa lors du rappel de cette tâche (Roullet et al. 2005). Chez l'Homme, une étude utilisant les techniques d'imagerie fonctionnelle, montre que l'activité du CP augmente lorsque les sujets doivent réaliser une tâche de discrimination olfactive (Dade et al. 2002).

Même si toutes ces études soulignent l'implication du CP dans la mémoire olfactive, son rôle reste encore à préciser.

II.1.f. Un rôle du cortex piriforme dans les apprentissages aversifs ?

Le CP étant impliqué dans la mémorisation des informations olfactives, on peut se demander quel rôle il joue dans l'apprentissage et/ou dans le rappel d'une AOC. Ses connexions avec l'AI pourraient permettre un échange d'informations olfactives et viscérales entre ces structures chez le Rat (Saper, 1982, Shipley et Sandner, 1982). Un tel échange pourrait être nécessaire à l'acquisition et/ou au rappel d'une AOC. En effet, Ruggiero et al. (1987) émettent l'hypothèse que le CP et les régions infralimbique et prélimbique du cortex préfrontal médian, par ailleurs interconnectées, pourraient influencer les réponses autonomes et viscérales via leurs projections sur des aires cérébrales régulant les fonctions cardiovasculaires. Plus récemment, Sevelinges et al. (2004) observent une modification transitoire des potentiels de champs évoqués dans le CPp par la présentation du stimulus conditionnel chez les rats ayant acquis une AOC.

En conclusion, le CP, région majeure du cortex olfactif primaire, semble jouer un rôle important, mais néanmoins encore imprécis, dans les phénomènes de discrimination olfactive et de mémorisation des odeurs. Il en est de même en ce qui concerne son implication dans la mémorisation ou le rappel d'événements aversifs mettant en jeu des stimuli odorants.

II.2. Le système gustatif du Rat.

II.2.a. La détection périphérique du goût.

La détection des molécules sapides se fait dans la cavité buccale au sein des bourgeons du goût localisés dans les papilles majoritairement présentes sur la face dorsale de la langue. La transduction du message chimique en message nerveux a lieu au niveau des cellules

sensorielles gustatives qui portent à leurs apex des récepteurs moléculaires. Ceux-ci vont capter les molécules sapides, ce qui va entraîner une cascade d'événements intracellulaires conduisant à la dépolarisation de la cellule et, ainsi, à la naissance du message nerveux. Celui-ci est ensuite véhiculé par trois nerfs crâniens (la branche du nerf facial (VII), le glosso-pharyngien (IX) et le nerf vague (X)) au Noyau du Tractus Solitaire (NTS), premier relais central du système gustatif.

II.2.b. Transmission des informations gustatives des premiers relais centraux au néocortex gustatif.

Le NTS, structure localisée dans le tronc cérébral, reçoit des informations autonomes et viscérales en plus des informations gustatives (Norgren 1995 ; Saper 2002). En plus de ces informations d'ordre sensoriel, le NTS reçoit des afférences provenant du cortex amygdalien (Spray et Bernstein, 2004). Bien que ces différentes projections soient spécifiques de leurs provenances, les territoires du NTS recevant les afférences gustatives, autonomes, viscérales et amygdaliennes se chevauchent (Blomquist et Antem, 1967). Les axones des neurones partant du NTS se dirigent majoritairement vers le second relais gustatif : le noyau parabrachial (PbN) (voir figure 4). Ce dernier, localisé dans le métencéphale dans la région du pont, reçoit également des informations viscérales. Il projette massivement vers la région parvicellulaire de la partie médiane du noyau ventropostéromédian du thalamus (VPMpc) et vers les noyaux latéral de l'hypothalamus et central de l'amygdale (Smith et St John, 1999).

Le VPMpc est un petit noyau du thalamus et la zone recevant les afférences gustatives est très restreinte (Kosar et al. 1984 ; Norgren, 1995). On peut noter que les informations viscérales arrivent aussi dans des régions adjacentes au VPMpc : les parties latérale du VP et médiane du VPM. Quelques neurones du VPMpc projettent vers le noyau latéral de l'amygdale, mais la majorité des afférences sont destinées au néocortex gustatif localisé dans le cortex insulaire.

II.2.c. Le cortex insulaire: le néocortex gustatif.

Le cortex insulaire occupe la région dorsale au sulcus rhinal et est bordé par les cortex somesthésiques primaire et secondaire (Paxinos et Watson, 1986). Le cortex insulaire est

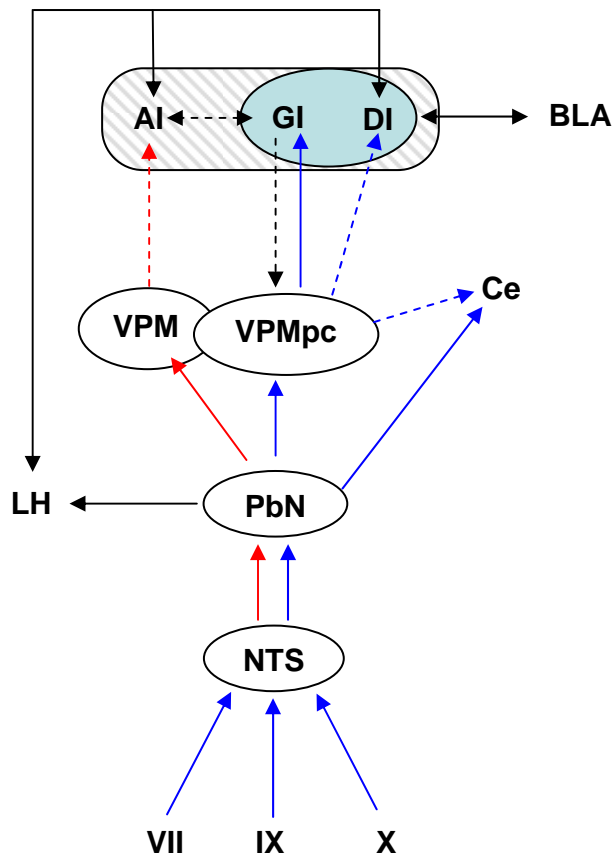
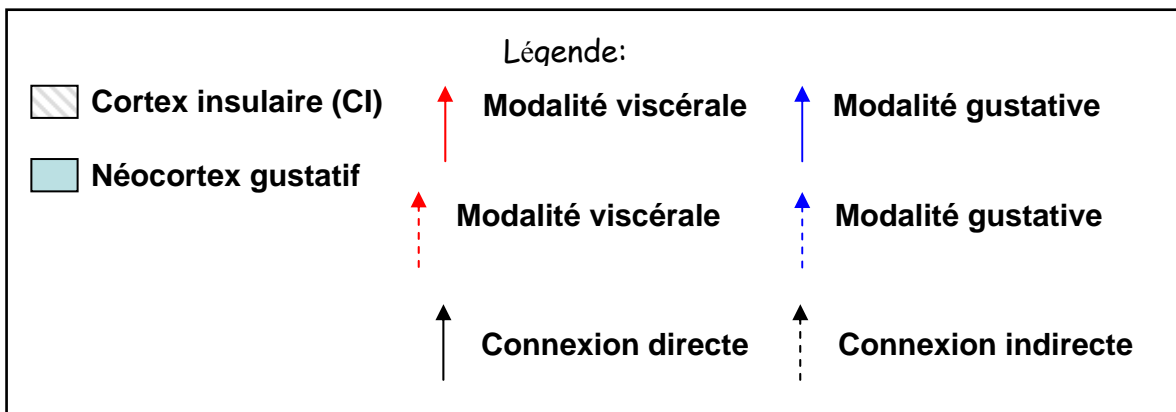


Figure 4: Principales afférences au cortex gustatif du Rat.



divisé en trois régions selon l'axe dorso-ventral : la région granulaire (GI), la région dysgranulaire (DI) et la région agranulaire (AI) (Kosar et al. 1986 ; Paxinos et Watson, 1986). Des études de traçage de voies ou d'électrophysiologie situent le cortex gustatif proprement dit dans une zone à cheval sur les régions GI et DI (Ogawa et al. 1990 ; Nakashima et al. 2000, Hayama et Ogawa 2001). En effet, des potentiels évoqués sont enregistrés dans le GI et le DI suite à la stimulation des nerfs IX et X innervant la langue (Yamamoto et al. 1980).

Les trois régions du cortex insulaire se différencient donc selon des critères morphologiques mais aussi au niveau de leurs connexions (figure 5):

- la région granulaire reçoit la majorité de ses afférences du VPMpc vers lequel elle projette en retour quelques axones. Cette région est également la cible de projections des cortex amygdalien (Allen et al. 1991) et infralimbique ainsi que du noyau accumbens (Sewards et Sewards, 2001). Notons, enfin, que le GI est fortement interconnecté avec le DI mais échange peu d'informations avec la région AI.
- La région dysgranulaire reçoit également des axones en provenance du VPMpc mais de façon moindre que le GI. Largement interconnecté avec le GI, le DI projette peu sur l'AI. On peut aussi noter que cette région reçoit quelques afférences du noyau endopiriforme. De plus, le DI est aussi fortement interconnecté avec le noyau BLA de l'amygdale, le PbN et le CPFm (Allen et al. 1991; Sewards et Sewards 2001). Il envoie également des afférences vers le noyau Ce de l'amygdale et le cortex périorrhinal.
- Enfin, la région agranulaire reçoit peu d'informations en provenance du VPMpc. En revanche, cette région est fortement interconnectée avec les régions latérales du VPM et du PbN. Ces noyaux sont connus pour leur rôle dans le traitement et la transmission des informations somesthésiques (Saper 1982 ; Sewards et Sewards 2001 ; Ogawa et Wang 2002). De plus, l'AI reçoit des fibres provenant d'aires olfactives telles que le BO, le CP ou le noyau endopiriforme. (Datiche et Cattarelli 1996 ; Sewards et Sewards 2001). Ces afférences sont soit directes soit indirectes après relais dans le noyau médiodorsal du thalamus. En retour, l'AI projette vers les noyaux amygdaliens BLA et Med, sur les cortex infralimbique, prélimbique et périorrhinal ainsi que sur le VPM, le PbN et le NTS.

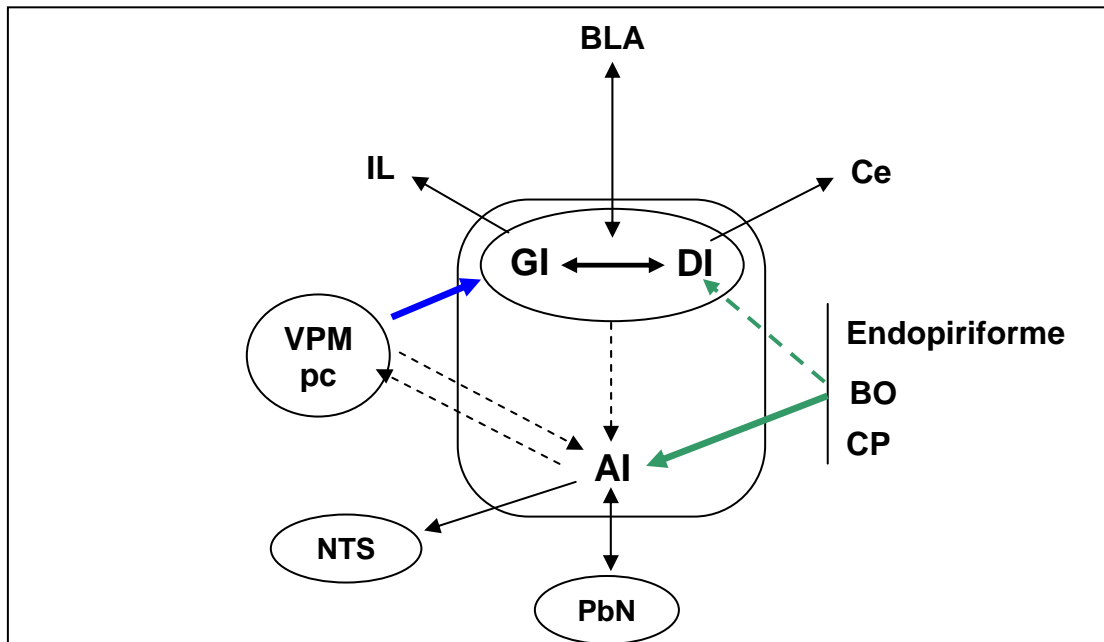
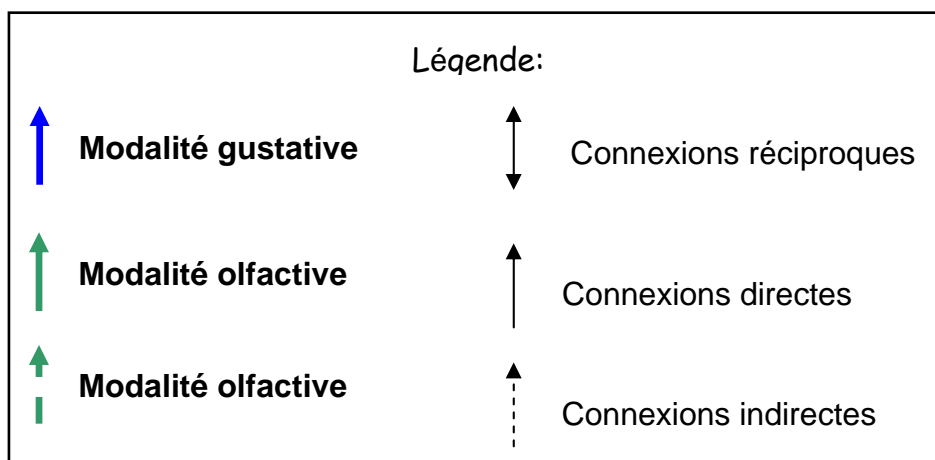


Figure 5: principales connexions du cortex néocortex gustatif.



Ainsi, en fonction de leurs connexions, on considère que les régions granulaire et dysgranulaire constitueraient le néocortex gustatif. La partie agranulaire serait, quant-à elle, une interface où convergeraient des modalités à la fois gustatives (via les projections du GI et du DI), olfactives et somesthésiques.

II.2.d. Le cortex gustatif et son implication dans la mémoire gustative et l'aversion gustative conditionnée.

Avant d'être transmises vers les relais thalamiques, les informations gustatives transitent d'abord par le NTS et le PbN. En tant que centre de convergence des informations gustatives, viscérales et somesthésiques, ces noyaux participent à l'acquisition de l'AGC (Grigson et al. 1997b ; Sakaï et Yamamoto 1998 ; Reilly 1999 ; Reilly et Triffunovic 2000 ; Shimura et al. 2002).

Le CI a fait, lui aussi, l'objet de nombreux travaux. Des études électrophysiologiques montrent que la stimulation de la langue par des stimuli sapides entraîne l'apparition de réponses électriques au sein dans la couche V de ce cortex (Yamamoto et al. 1984b). Par ailleurs, son rôle dans l'AGC a été également très étudié. Des expériences utilisant des lésions ou des ablations des différentes régions de ce cortex montrent que les zones antérieure et centrale sont nécessaires pour l'acquisition de l'AGC (Garcia et Rusiniak 1974 ; Lasiter et al. 1982 ; Nerad et al. 1996). Néanmoins, Lasiter et al. (1985a) précisent que l'incapacité des rats, ainsi lésés, à acquérir l'AGC n'est pas due à un problème de détection gustative puisque ces mêmes lésions ne perturbent pas les réponses à des tests de réactivité ou de préférence gustatives. Ces résultats ont été complétés par d'autres travaux d'électrophysiologie (Yasoshima et Yamamoto 1998 ; Escobar et Bermúdez-Rattoni 2000), de détection de l'expression de la protéine Fos (Koh et Bernstein 2005) et des approches biomoléculaires s'intéressant aux événements intracellulaires survenant dans ce cortex (Rosenblum et al. 1995 ; Yasoshima et Yamamoto 1997 ; Miranda et al. 2003a). Toutes ces études indiquent que les régions GI et DI du cortex insulaire, sont nécessaires pour que les animaux puissent acquérir une AGC et se la rappeler. En plus de son rôle dans la mémoire gustative, le CI échange des informations avec les noyaux BLA et centraux de l'amygdale. L'induction de la PLT dans les projections BLA-CI augmente la rétention de l'association entre la saveur et le goût (Escobar et Bermúdez-Rattoni, 2000), ce qui laisse supposer qu'une interaction entre l'amygdale et le CI serait importante pour l'apprentissage de l'AGC (Bielavska et Roldan 1996).

Bien que le rôle du CI soit bien établi dans le phénomène d'AGC, peu d'études se sont intéressées à son implication dans l'AOPG. Néanmoins, Kiefer et al. (1982) montrent qu'une lésion étendue du néocortex gustatif ne perturbe ni l'apprentissage ni la rétention de l'AOPG ou d'une AOC. En revanche, une lésion de sa seule région antérieure bloque l'apprentissage

de l'AOPG (Lasiter et al 1985b, Sakaï et Yamamoto 2001). Ainsi, la partie gustative, c'est-à-dire la plus antérieure, serait impliquée dans l'acquisition de l'AOPG.

En conclusion, de nombreuses structures du système gustatif sont mises en jeu lors des apprentissages aversifs. De plus, leurs connexions avec les régions viscérales et olfactives suggèrent qu'elles jouent un rôle complexe dans l'intégration de ces signaux. Ainsi, le système gustatif du rat apparaît aussi complexe que le système olfactif, que ce soit au niveau de ses connexions ou de son implication dans le comportement de l'animal et le néocortex gustatif semble être la région indispensable pour l'acquisition et le maintien de l'aversion gustative.

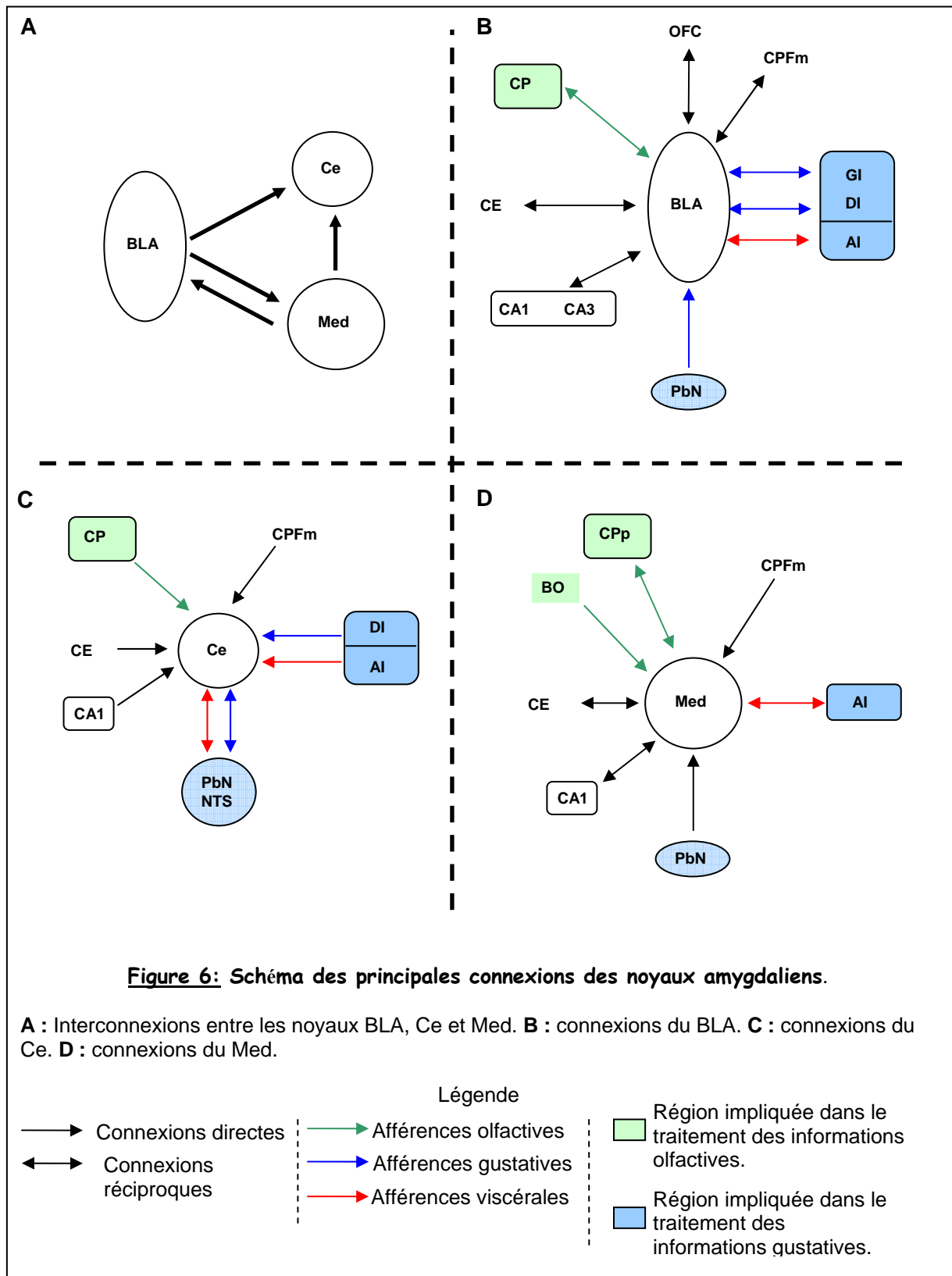
II.3. Structures cérébrales en relation avec les cortex olfactif et gustatif.

II.3.a. L'Amygdale.

- Anatomie et connexions du complexe amygdalien.

L'amygdale (AMYG), dont le nom provient de sa forme en amande, est localisée ventralement dans le lobe temporal. L'AMYG est un ensemble hétérogène d'environ treize noyaux, regroupés en trois grands groupes : les noyaux profonds, les noyaux centro-médians et les noyaux superficiels (Mc Donald 1998 ; Pitkanen 2000). Parmi tous ces noyaux, l'attention des chercheurs s'est principalement focalisée sur les noyaux basolatéral (BLA), central (Ce) et médian (Med) qui sont, d'une part interconnectés (figure 6-A), et d'autre part en relation avec de nombreuses structures cérébrales. Les principales connexions sont schématisées dans la figure 6 (B, C et D). On peut remarquer que ces noyaux reçoivent des projections directes du bulbe olfactif et du CP (Price 1973 ; Luskin et Price 1983). De plus, le CP se projette aussi indirectement sur l'amygdale via le cortex infralimbique et la région ventrale du cortex agrulaire insulaire (AI) (Luskin et Price 1983). Le BLA, le Ce et le Med reçoivent également des afférences soit gustatives soit provenant de régions impliquées dans le traitement des informations viscérales (Pitkanen et al. 1997 ; Mc Donald 1998 ; Swanson et Petrovitch 1998 ; Pitkanen 2000 ; Sah et al. 2003). La majorité de ces projections sont

réciroques. En outre, ces noyaux sont aussi connectés aux cortex périrhinal et entorhinal, à l'hippocampe et aux régions néocorticales orbito-frontale et médiane.



- Implications fonctionnelles.

- L'amygdale et le traitement central des informations émotionnelles.

Depuis les premières observations de Papez, l'AMYG est apparue comme un site essentiel pour le traitement des stimuli négatifs et l'élaboration de réponses adaptées aux émotions suscitées telles que la peur ou la douleur chez l'Homme ou l'animal. Les Primates (Singe ou Homme) présentant des lésions du lobe temporal manifestent des déficits marqués dans l'expression de la peur (Bussy et Klüver 1955 ; Adolph et al. 1999 ; Kalin et al. 2001). Ces observations étayaient l'hypothèse de Papez (1937) sur de l'existence d'un réseau de structures cérébrales qui gèreraient les réponses émotionnelles. L'organisation anatomique de ce « circuit de Papez » ou circuit limbique a subi de nombreuses modifications au fil du temps et son existence est encore remise en cause par certains auteurs (Morgane et Molker 2006). Néanmoins, l'AMYG reste encore le centre d'intérêt de nombreuses recherches, notamment celles qui s'attachent à décoder comment le cerveau, humain ou animal, réagit et s'adapte aux stimuli négatifs ou liés à la peur (Gallagher et Chiba 1996 ; Cardinal et al. 2003).

Pour explorer son implication dans le traitement des émotions, le paradigme le plus utilisé est la peur conditionnée. Cet apprentissage associatif est basé sur la relation temporelle établie entre un stimulus (lumière, son, odeur, etc.) et la délivrance d'un choc électrique dans les pattes de l'animal. De cet apprentissage résulte une réponse émotionnelle conditionnée et le rat s'immobilise totalement (« freezing ») lors de la présentation du stimulus. Pour analyser le rôle que tiendrait l'AMYG dans ce type d'apprentissage, diverses approches ont été utilisées: lésions (Hatfield et al. 1996 ; Cousens et Otto 1998 ; Gale et al. 2004), blocage, réversible ou non, (Kilpatrick et Cahill 2003), application d'inhibiteurs de synthèse protéique (Nader et al. 2000) ou encore, détection de l'activation de gènes précoces immédiats (Hall et al. 2001 ; Holahan et White 2004 ; Malkani et al. 2004). Toutes ces études indiquent que les noyaux basolatéral et central seraient non seulement nécessaires pour l'acquisition de l'association stimulus-choc (LeDoux 2000) mais également importants pour le rappel d'une peur conditionnée (Boujabit et al. 2003).

L'AMYG, et plus particulièrement le Med, est également impliqué dans la réaction d'immobilité des rats confrontés à une odeur de prédateur. Ainsi la présentation de la triméthyle thiazoline (isolée des fèces de Renard) ne suscite pas de réaction chez des rats dont le Med est lésé (Müller et Fendt 2004). Ce résultat complète une expérience de Day et al. (2004) qui montre que la stimulation par la triméthyle thiazoline entraîne une forte

augmentation de l'expression de Fos dans le Med. Chez l'Homme, l'AMYG s'active lorsque l'on présente aux sujets des images à connotations négatives (Peper et al. 2006 ; Wright et al. 2006).

Alors que le rôle de l'AMYG dans les réponses aux événements ou émotions négatifs commence à être de mieux en mieux compris, quelques études indiquent qu'elle participerait aussi à un réseau cérébral impliqué dans le traitement des émotions positives (obtention d'une récompense par exemple) (Cardinal et al. 2003). Chez l'Homme, la présentation de stimuli visuels ou auditifs agréables entraîne une diminution de l'activité de l'AMYG (Zald 2003).

L'AMYG occupe donc une place importante dans le traitement d'informations, de diverses origines, ayant une valeur émotionnelle. En outre, elle est aussi nécessaire pour la consolidation des traces mnésiques relatives aux émotions (Mc Gaugh et al. 2000 ; Mc Gaugh 2002, 2004 ; Paré 2003). L'existence d'un réseau reliant l'AMYG, le CE (et le cortex périrhinal) et l'Hipp permettrait à l'AMYG de moduler le stockage et le rappel des informations par l'Hipp (Akirav et Richter-Levin 2002 ; Kajiwara et al. 2002 ; Fujisaki et al. 2004 ; Paz et al. 2006). Le noyau basolatéral est également en relation avec le cortex orbito-frontal latéral. En utilisant un apprentissage de type Go-NoGo, des études électrophysiologiques montrent que le BLA permet le codage de la valeur émotionnelle du signal olfactif. Le message, ainsi élaboré, gagne le COF qui va alors pouvoir programmer une réponse comportementale adaptée (Schoenbaum et al. 1999, 2000, 2003 ; Saddoris et al. 2005). Ces résultats se voient confirmés par des expériences utilisant le blocage et/ou l'inhibition de la synthèse protéique qui montrent que le BLA est nécessaire pour la consolidation mais aussi pour le rappel d'un apprentissage tel que la peur conditionnée (Rooszendaal et al. 1999 ; Power et al. 2003).

- L'amygdale et le traitement des informations olfactives et gustatives: implication dans les préférences et les aversions alimentaires.

Le BLA, le Ce et le Med reçoivent des afférences olfactives, gustatives mais aussi viscérales. De ce fait, ils pourraient participer à la mémorisation des signaux sensoriels en relation avec le comportement alimentaire. En effet, l'expression de Fos augmente dans ces noyaux lors de l'acquisition d'une discrimination olfactive. En revanche, la seule association odeur-récompense n'entraîne une augmentation de Fos que dans le BLA (Hess et al. 1997). Le blocage réversible du BLA par la tétradotoxine altère la consolidation de l'apprentissage

d'une association odeur-choc (Kilpatrick et Cahill 2003) et sa lésion excitotoxique perturbe à la fois l'acquisition et le rappel de cette tâche (Cousens et Otto 1998). Les noyaux BLA et Ce sont également mis en jeu lors de la mémorisation d'informations gustatives. Ainsi, la présentation d'un goût inconnu accroît l'expression du gène c-fos dans le Ce (Koh et al. 2003) et la perturbation de l'activité noradrénergique du BLA altère la formation de l'AGC (Miranda et al. 2003b).

Parallèlement à leur implication dans la mémoire olfactive et gustative, l'AMYG, le BLA en particulier, semble être une structure clé pour l'apprentissage d'une préférence alimentaire. En effet, sa lésion empêche les animaux d'acquérir une préférence conditionnée pour une flaveur (Gilbert et al. 2003 ; Touzani et Sclafani, 2005) mais pas pour une saveur (Touzani et Sclafani, 2005). Outre la perturbation de l'acquisition d'un tel apprentissage, la lésion de l'AMYG accélère aussi son extinction (Sakai et Yamamoto 2001). Le Ce serait également impliqué dans le comportement alimentaire via les modulations qu'il exerce sur les neurones gustatifs du PbN (Huang et al. 2003).

L'implication de l'AMYG dans l'établissement des choix alimentaires est aussi liée à sa participation aux phénomènes aversifs. Ici encore, c'est le BLA qui joue un rôle primordial dans l'acquisition mais aussi la consolidation de la trace mnésique de l'aversion. En effet, le blocage de son activité (Lamprecht et Dudai 1996 ; Yasoshima et al. 2006a), sa lésion (Morris et al. 1999) ou l'inactivation de la synthèse protéique à son niveau (Lamprecht et Dudai 1996 ; Lamprecht et al. 1997 ; Bahar et al. 2003) empêche l'acquisition d'une AGC. De plus, il semblerait qu'une activité β -adrénergique et glutamatergique normale soit nécessaire pour l'établissement de l'AGC (Tucci et al. 1998 ; Miranda et al. 2002). Pour l'AOC en revanche, ce serait le Med qui jouerait un rôle important. En effet, lors de l'établissement d'une AOC l'expression de la protéine Fos augmente très fortement dans ce noyau (Schettino et Otto 2001). Malgré ces importantes afférences viscérales, le Ce ne semble pas jouer de rôle majeur dans l'établissement de l'aversion, qu'elle soit olfactive ou gustative. Enfin, chez l'Homme l'imagerie cérébrale montre que l'AMYG s'active lors de la présentation de stimuli olfactifs ou gustatifs considérés comme désagréables, voire aversifs, par les sujets (Zald et al. 1998). L'AMYG est aussi nécessaire pour l'acquisition de l'AOPG puisque sa lésion empêche les animaux d'effectuer cet apprentissage. En affinant la localisation des lésions, Bermúdez-Rattoni et al. (1986) précisent que c'est le BLA qui est responsable. Sa lésion avant la session d'acquisition empêche le développement de l'AOPG (Hatfield et al. 1992). Son inactivation, par injection de muscimol, bloque également cet apprentissage, que l'injection soit faite avant ou juste après la présentation du stimulus conditionnel (odeur et goût) lors de la session

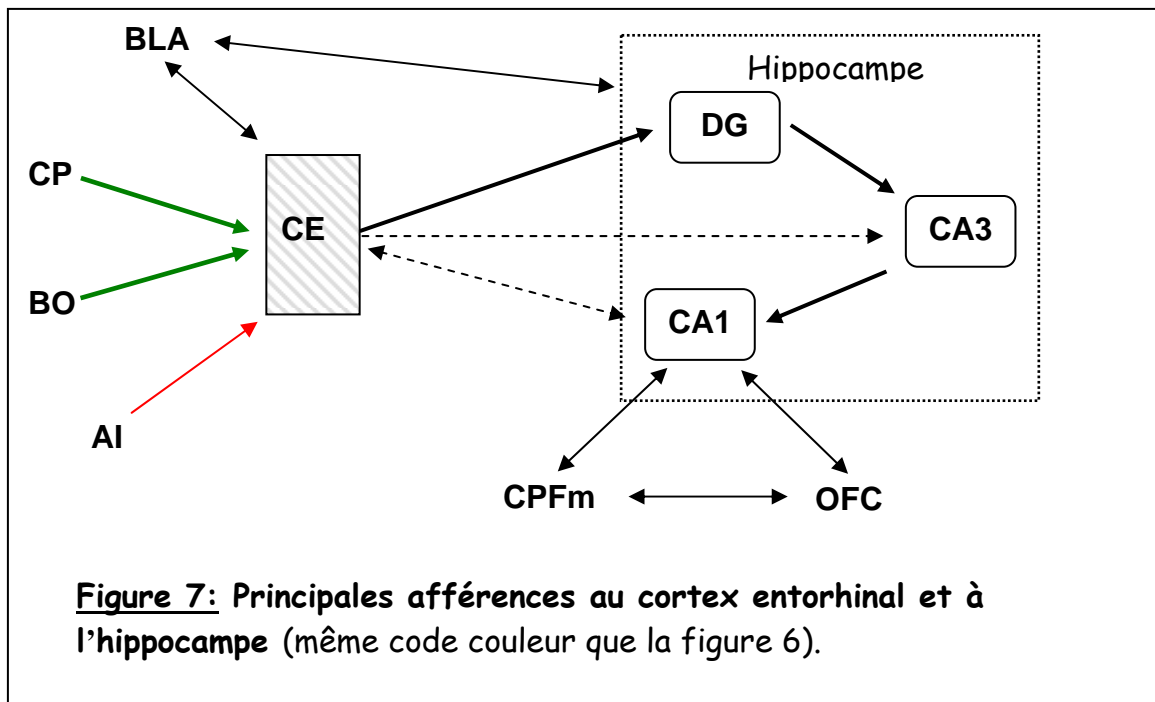
d'acquisition; par contre, pratiquées juste avant le rappel de l'AOPG, elle reste sans effet (Ferry et al. 1995). Ainsi, le BLA, s'il paraît être indispensable pour l'acquisition de l'AOPG, semble, en revanche, peu impliqué dans son rappel.

II.3.b. La région hippocampique.

- Anatomie.

Chez le Rat, le cortex entorhinal occupe la majeure partie postéro-ventrale du télencéphale. Ce cortex est divisé en deux principales régions: l'aire périrhinale (la plus rostrale) et l'aire entorhinale en position postérieure et latérale. Comme le CP, le CE est constitué de plusieurs couches cellulaires interconnectées et possède deux systèmes de fibres d'association, intrinsèques et extrinsèques. Cette particularité anatomique a conduit certains auteurs (Egorov et al. 2002 ; Fyhn et al. 2005) à émettre l'hypothèse que le CE serait, lui aussi, un modèle de cortex associatif. Il établit des connexions réciproques avec le BLA et reçoit également des projections du CP, du BO, de l'AI, de l'aire tegmentale ventrale, du raphe dorsal, du noyau reuniens et de l'Hipp (Beckstead 1978 ; Wyss 1981 ; Witter et al. 1989 ; Amaral et Witter 1995). La majorité des afférences du CE constitue la voie perforante, principale entrée des informations dans l'hippocampe.

L'hippocampe, se replie sur lui-même au long de son axe rostro-caudal. Il est formé de plusieurs régions connectées entre elles: le Gyrus Denté (GD) et les Cornes d'Ammon (CA) : CA1, CA2 et CA3 (Amaral et Witter 1995). C'est au niveau du GD qu'arrive la majorité des afférences provenant du CE. En retour, le GD projette massivement, par les fibres moussues, sur le CA3. Ce dernier projette sur CA1 via les collatérales de Schaffer (figure 7). Enfin le champ CA1 envoie, en retour, ses axones vers le CE. Enfin, l'hippocampe possède des connexions directes avec des régions sous-corticales telles que l'AMYG, l'hypothalamus et le thalamus (Amaral et Witter 1995) et indirectes avec le néocortex (Ongür et Price 2000).



- Un rôle pour le cortex entorhinal et l'hippocampe dans les apprentissages olfacto-gustatifs ?

En ce qui concerne le CE, plusieurs études montrent son implication dans la mémoire olfactive. En effet, sa lésion:

- associée à celle de l'aire périrhinale, perturbe les capacités des rats lors d'une tâche de reconnaissance olfactive complexe sans en empêcher l'acquisition (Otto et Eichenbaum 1992).
- faciliterait l'apprentissage d'une tâche de reconnaissance olfactive (Wirth et al. 1998).
- suscite une augmentation de l'expression des gènes *c-fos*, *junB* et *zif268* dans le BLA et l'Hipp par rapport à des animaux témoins (Bernàbeu et al. 2006).
- améliore l'acquisition d'une AOC même si le délai entre la stimulation olfactive et l'injection de LiCl est de 2h (Ferry et al. 1996).

D'autre part, ce cortex semblerait moduler la mémoire olfactive à court ou moyen terme de l'odeur en exerçant un contrôle sur l'activité GABA-ergique d'autres structures cérébrales telles que le BLA (Ferry et al. 1999).

Si le CE semble jouer un rôle dans la mémorisation des messages olfactifs présentant une valeur biologique, son implication dans la mémorisation de signaux gustatifs semble

mineure. Ainsi sa lésion, ne perturbe pas l'acquisition d'une AGC (Ferry et al. 1996 ; Ward-Robinson et al. 2005).

L'hippocampe est considéré comme une structure majeure pour la mémorisation des informations; en effet, c'est à ce niveau qu'a été mis en évidence pour la première fois le phénomène de potentialisation à long terme (PLT) d'abord *in vitro* puis *in vivo* (Bliss et Lomo 1973 ; Bliss et Collingridge 1993). Outre son rôle bien établi dans la mémoire spatiale, l'hippocampe semble intervenir dans les apprentissages olfactifs et gustatifs.

Toutefois sa participation dans ces comportements reste encore floue. En effet, la lésion, uni- ou bilatérale de l'Hipp, ne perturbe pas l'acquisition d'une tâche de discrimination olfactive alors qu'elle affecte la mémoire spatiale (Li et al. 1999). De même, l'expression de Fos n'est pas modifiée suite au rappel d'une association olfactive rapidement acquise (Tronel et Sara, 2002). En revanche, l'expression du gène *c-fos* (Hess et al. 1995 a, b) ou celle de la protéine Fos (Rouillet et al. 2005) indique une hétérogénéité du marquage dans les champs CA1 et CA3 après apprentissage d'une tâche de discrimination olfactive. Les études électrophysiologiques indiquent que le GD serait impliqué dans la mémoire olfactive. En effet, Chaillan et al. (1999) observent une modification des potentiels évoqués du GD lors de l'établissement d'une association odeur-récompense. De plus, Vanderwolf (2001) note que l'activité β du GD caractérise le flairage olfactif induit par une odeur et n'apparaît pas lorsque ce comportement est déclenché par un autre type de stimulus (visuel, auditif...). Enfin, l'Hipp répondrait à la valeur biologique d'un stimulus olfactif puisque, lors d'une tâche de discrimination olfactive, l'amplitude du potentiel de champ évoqué dans le GD diminue en réponse au signal négatif (Mouly et al. 2001 ; Mouly et Gervais 2002).

L'Hipp est impliqué dans le codage rapide d'expérience acquise en une fois (Nakazawa et al. 2003), et semble participer à l'établissement des traces mnésiques liées à l'aversion. En effet, la modulation de l'activité cholinergique de l'Hipp perturbe l'acquisition de l'AOC et de l'AOPG sans perturber celle de l'AGC (Bermúdez-Rattoni et al. 1987). La lésion de l'Hipp altère également l'acquisition d'une aversion au contexte (Aguado et al. 1998). De plus, il a été montré récemment que l'inactivation de l'Hipp par application de muscimol améliore fortement l'acquisition d'une AGC (Stone et al. 2005).

Ainsi, bien que ne jouant pas un rôle direct, le CE et l'Hipp, de par leurs connexions centrales, pourraient néanmoins participer à l'acquisition d'une aversion (AOC et/ou AGC).

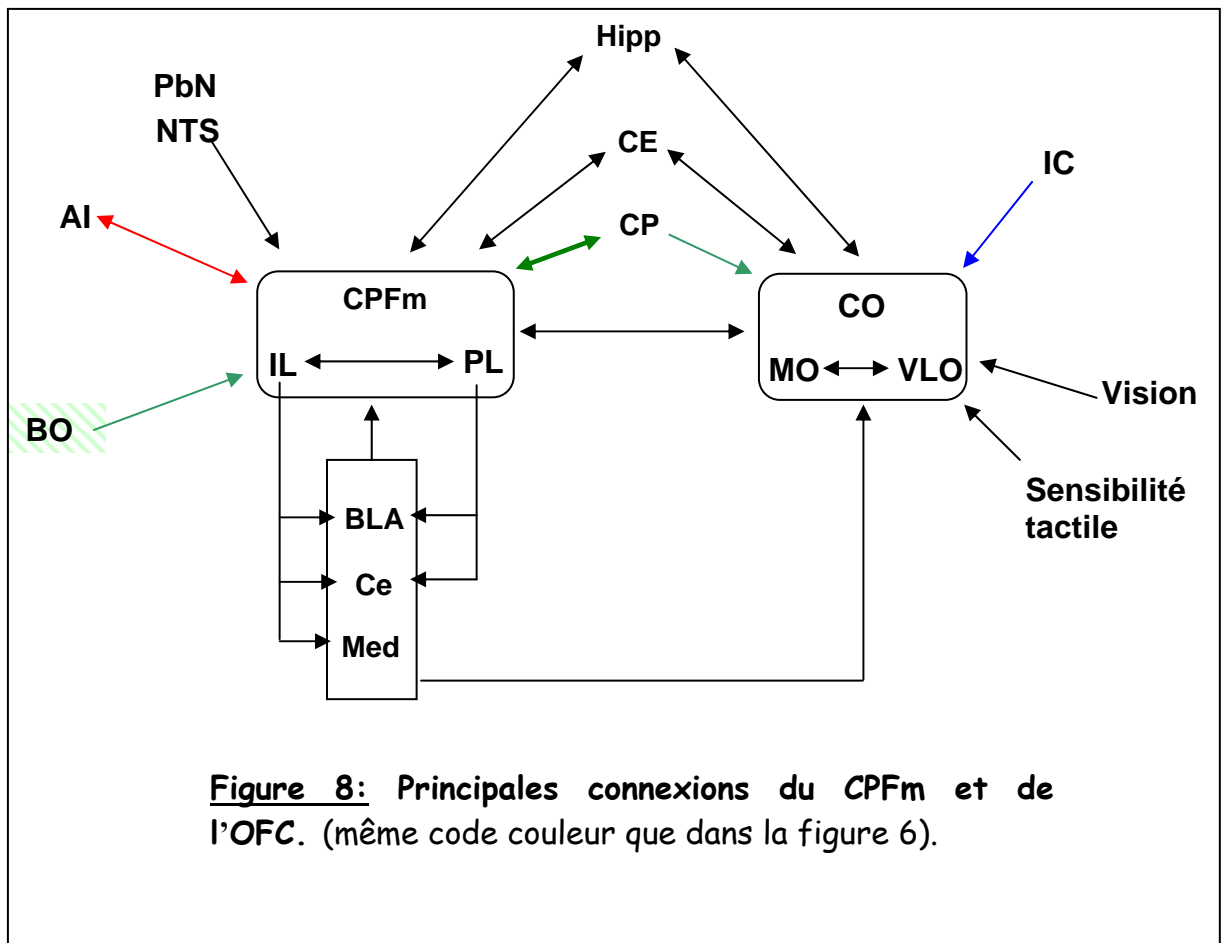
II.3.c. Les aires néocorticales: cortex orbito-frontal, infralimbique et prélimbique du cortex préfrontal.

- Anatomie.

Les cortex orbito-frontal et préfrontal médian sont localisés dans le télencéphale antérieur chez le Rat. Situés juste à l'avant des aires prémotrices et s'étendant jusqu'au corps calleux, ils présentent une architecture en six couches cellulaires distinctes (Zylles et Wree 1995). Les anatomistes divisent la région frontale en de multiples aires en fonction de leurs connexions. Par convention, et suivant de nombreux auteurs (Dalley et al. 2004), nous avons adopté la nomenclature suivante:

- le cortex orbito-frontal (COF) regroupe, les cortex orbito-ventral, orbito-ventrolatéral et orbito-latéral.
- le cortex préfrontal médian (CPFm) englobe les cortex précentral, cingulaire antérieur, prélimbique, infralimbique et orbito-médian. Dans toute la suite de ce travail, nous centrerons notre intérêt sur les aires infra- et prélimbiques.

Ces régions corticales reçoivent des informations venant des cortex olfactif et gustatif (figure 8). En effet, l'injection intracellulaire d'amine dextran biotinylée montre que de nombreux axones du CP se terminent par de denses arborisations dans les régions préfrontales et, qu'en retour, celles-ci se projettent massivement sur le CP (Johnson et al. 2000). Ainsi, ce cortex olfactif est en relation avec les régions situées dans la partie latérale du cortex orbito-frontal (Price, 1985). Par traçages rétro- et antérograde avec la toxine cholérique, Datiche et Cattarelli (1996) ont mis en évidence une organisation topographique de ces connexions et précisé que c'est principalement le CPa qui est en relation avec le COF. Enfin, le CP reçoit aussi des projections en provenance des régions infra- (IL) et prélimbique (PL) du néocortex (Sesack et al. 1989). Quant-aux informations gustatives arrivant sur ces régions, elles proviennent principalement des noyaux PbN et NTS (Terreberry et Neafsey 1983 ; Ongür et Price 2000 ; Vertés 2004, 2006) et du cortex insulaire (Ongür et Price 2000 ; Rolls 2001).



Le cortex orbito-frontal et les régions IL et PL sont également connectées à des structures limbiques : l'Hipp (Zylles et Wree 1995 ; Ongür et Price 2000 ; Schoenbaum et al. 2003) et les noyaux amygdaliens BLA, Ce et Med (Ongür et Price 2000 ; Pitkänen 2000 ; Vertés 2004).

Enfin, notons que les projections du NTS véhiculent aussi des informations viscéroceptives (Vertés 2004). Ces aires néocorticales reçoivent également des afférences des aires impliquées dans la vision et la sensibilité tactile (Delatour et Witter 2002), ce qui laisse penser qu'elles joueraient un rôle d'intégrateur.

- Implications fonctionnelles

Le COF et les aires IL et PL, cibles d'afférences de nombreuses modalités, se trouvent donc en position centrale pour l'élaboration de réponses comportementales adaptées.

Ces aires néocorticales sont impliquées dans de nombreux comportements. Par exemple, la lésion du COF et du PL, après acquisition d'une peur conditionnée, rend les rats moins réactifs au contexte sans toutefois modifier leur réponse au stimulus associé avec le choc électrique (Morgan et LeDoux 1999). Ces observations sont confirmées par Thomas et al. (2002) qui n'observent pas de modification dans l'expression de Zif268 lors du rappel d'un tel apprentissage.

Le COF participe à la mémorisation des informations olfactives. En effet des enregistrements électrophysiologiques de ce cortex chez le Rat (Schoenbaum et Eichenbaum 1995 ; Yonemori et al. 2000 ; Roesch et al. 2006) mais aussi chez le Macaque (Rolls 2001) ont montré que les réponses des neurones de cette région sont modifiées lors de l'apprentissage d'une tâche de discrimination olfactive. Ces résultats confirment ceux obtenus par lésion du COF : les rats ainsi lésés ne peuvent acquérir une discrimination olfactive (Otto et Eichenbaum 1992). Le rôle de ce cortex dans la mémoire olfactive résulterait de ses interconnexions avec l'AMYG (Schoenbaum et al. 1999, 2003).

L'activité noradrénergique et glutamatergique du PL, est, elle aussi, nécessaire pour la consolidation d'une association odeur-récompense (Tronel et al. 2003 ; Tronel et al. 2004). Bien qu'impliqués dans la mémoire olfactive le COF et le CPFm ne semblent pas participer directement à l'acquisition ou au rappel d'une aversion, qu'elle soit olfactive ou olfactive potentialisée par le goût (Lasiter et al. 1985b). Néanmoins, le CPFm est nécessaire pour l'acquisition, le rappel et l'extinction d'une AGC (Hernàdi et al. 2000 ; Mickley et al. 2005 ; Akirav et al. 2006).

AGC	Acquisition	BLA	Hipp*	CPFm*	IC
	Rappel		Hipp*	CPFm*	IC
AOC	Acquisition	Med	Hipp*	OFC*	
	Rappel				
AOPG	Acquisition	BLA	Hipp*	OFC*/CPFm*	IC*
	Rappel				

Tableau 2: Régions cérébrales impliquées dans l'acquisition et le rappel de l'AGC, AOC et l'AOPG.

Les données proviennent de travaux utilisant des lésions et des approches pharmacologiques. Le * indique des résultats controversés dans la littérature.

II.4. Conclusion.

Nous avons noté que de nombreuses structures cérébrales interviennent dans les comportements mettant en jeu l'olfaction et la gustation. Comme nous l'avons décrit, toutes ces régions télencéphaliques entretiennent des relations complexes qui autorisent l'intégration des informations de diverses modalités sensorielles: olfactive, gustative, somesthésique, etc...

Néanmoins, leurs implications fonctionnelles dans l'acquisition ou le rappel des phénomènes aversifs n'est pas aussi clair que leurs connexions anatomiques pourraient le laisser penser. Le tableau 2 résume les données de la littérature sur la participation de certaines structures dans l'acquisition et/ou le rappel des aversions comme l'AOC, l'AGC et l'AOPG. Cependant, étant donné la multiplicité des approches (lésionnelles, pharmacologiques, etc...) utilisées pour mettre en évidence le rôle de ces régions cérébrales dans ces apprentissages particuliers, les données bibliographiques sont souvent en contradiction, notamment dans le cas de l'AOPG. De plus, peu d'études ont examiné le substrat neuro-anatomique qui sous tend l'AOPG (comme le montre la ligne rappel de l'AOPG dans le tableau 2).

Toutefois, comme le montrent ces tableaux, quelques structures, qui pourraient constituer des réseaux fonctionnels, semblent émerger. En effet, le noyau basolatéral de l'AMYG, le cortex insulaire et l'hippocampe apparaissent nécessaires pour l'acquisition et/ou le rappel de l'AGC et l'AOPG. Notons que les structures qui seraient impliquées dans l'AOC diffèrent de celles mises en jeu dans les autres apprentissages aversifs. Cette différence pourrait tenir au faible nombre de données disponibles concernant l'AOC.

III- Les gènes précoces immédiats *c-fos* et *zif268*.

Les neurophysiologistes ont mis en évidence qu'au moins deux phénomènes rendraient compte des modifications synaptiques au cours de l'apprentissage: la potentialisation à long-terme (PLT) et la dépression à long-terme. Bien que ces modifications électriques soient robustes, elles ne sont que transitoires. Pour que les neurones puissent renforcer leurs contacts synaptiques, pour établir un réseau stable et fonctionnel, il faut que ces cellules subissent des modifications morphologiques et fonctionnelles. Ces changements neuronaux reposent sur des synthèses protéiques qui sont sous dépendance des gènes précoces immédiats.

III.1. Les gènes précoces immédiats et leurs fonctions

III.1.a. Nature, activation et rôle des gènes précoces immédiats.

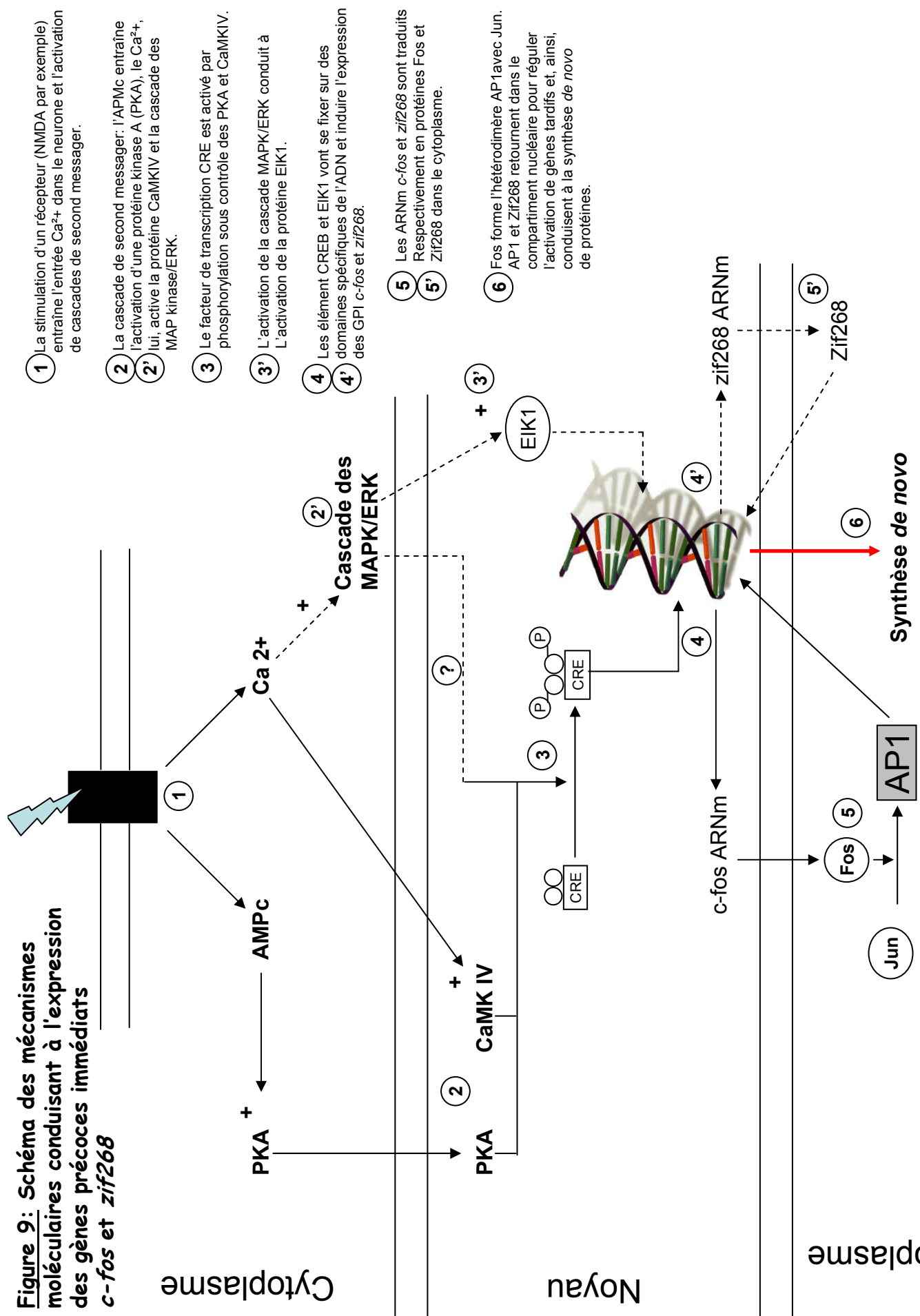
La stimulation des neurones (figure 9) lors des échanges synaptiques activent divers récepteurs, tels que les récepteurs NMDA, ce qui déclenche des cascades moléculaires impliquant :

- la mise en jeu de seconds messagers (l'AMPc par exemple)
- la modification des concentrations intracellulaires de certains ions (comme le Ca^{2+})
- l'activation de la cascade des MAP Kinases.

Ces différentes voies conduisent à la phosphorylation de facteurs de transcription constitutifs tels que les protéines « c-AMP-response-element-binding » (CREB) ou EIK1. Ces éléments se lient ensuite à des domaines particuliers de l'ADN, induisant ainsi l'activation des gènes précoces immédiats. La synthèse d'ARNm et de protéines induite par les facteurs de transcription constitutifs est rapide et transitoire (Sheng et Greenberg 1990 ; Herdegen et Leah 1998, Lonze et Ginty 2002 ; Knapska et Kaczmarek 2004).

La famille des gènes précoces immédiats est constituée de deux grandes classes : les gènes effecteurs et les facteurs de transcription inductibles. Les gènes effecteurs codent des protéines structurales qui agissent directement sur la morphologie et la physiologie des

Figure 9: Schéma des mécanismes moléculaires conduisant à l'expression des gènes précoces immédiats *c-fos* et *zif268*



Légende: + : activation

Voie de transduction de Fos / Voie de transduction de Zif268

cellules. Dans cette famille, on retrouve les protéines Arc et la synaptophysine qui modifient la forme du cytosquelette du neurone. La classe des facteurs de transcription inductibles est constituée de protéines qui vont activer des gènes, dit tardifs, qui induiront des modifications structurales et/ou fonctionnelles au sein des cellules (Lemaire et al. 1990 ; Platenik et al. 2000). Les protéines Fos et Zif268 appartiennent à cette famille.

III.1.b. Les gènes précoces immédiats *c-fos* et *zif268*.

Le gène *c-fos* code la protéine Fos, constituée de 380 acides aminés de 55 à 62 KDa. La protéine Fos présente la particularité de ne pas pouvoir se lier directement à l'ADN et doit, pour ce faire, constituer un hétérodimère avec une autre protéine: Jun. La protéine Jun provient de l'activation du gène *c-jun*. L'interaction entre Fos et Jun donne naissance au complexe AP1 (« Activated Protein 1 ») qui se fixe à l'ADN sur un domaine TRE (« Transcription Response Element ») permettant alors l'activation de gènes tardifs (Chaudhuri et al. 2000). La transcription du gène *c-fos* débute entre 5 et 10 min après la stimulation cellulaire, et la quantité d'ARMm est maximale après 30 à 40 min. Le pic d'expression de la protéine Fos est atteint après environ 90 min (Müller et al. 1984), sa concentration diminue ensuite rapidement, certainement par la formation du complexe AP1 (Chaudhuri et al. 2000).

Le gène *zif268* (aussi connu sous le nom de *Egr1*, *NGFIA*, *TIS8*, *Krox 24* ou encore *zenk*) code la protéine Zif268 (« zinc finger binding protein clone 268 »). Cette dernière, d'un poids moléculaire de 80 à 88 KDa, appartient à la famille des *Egr*, une famille de facteurs de transcription à doigt de zinc (Herdegen et Leah 1998). En effet, la caractéristique principale de Zif268 est la présence d'un motif constitué de trois doigts de zinc, formant un domaine de liaison à l'ADN (Gasher et Sukhatme 1995). Ainsi, contrairement à Fos, Zif268 peut se lier directement à l'ADN et induire la synthèse d'autres protéines. Elle peut se fixer à l'ADN par plusieurs domaines, des ERE (« Egr Response Element »), des SRE (« Serum Response Element ») et des CRE (« cAMP Response Element ») mais aussi par des motifs de liaison proches de ceux d'AP1 (Herdegen et Leah 1998). Zif268 peut aussi interagir avec des séquences spécifiques, lui permettant ainsi de s'autoréguler. Comme pour *c-fos*, la transcription du gène *zif268* est très rapide et la quantité d'ARMm atteint son maximum en 20 min. Alors que Fos diminue après avoir atteint un pic d'activation, l'expression de Zif268 reste constante tant que la cellule reste stimulée (Chaudhuri et al. 2000). La figure 10 illustre les profils d'expression de Fos et de Zif268 après diverses stimulations (Kaczmarek 2000).

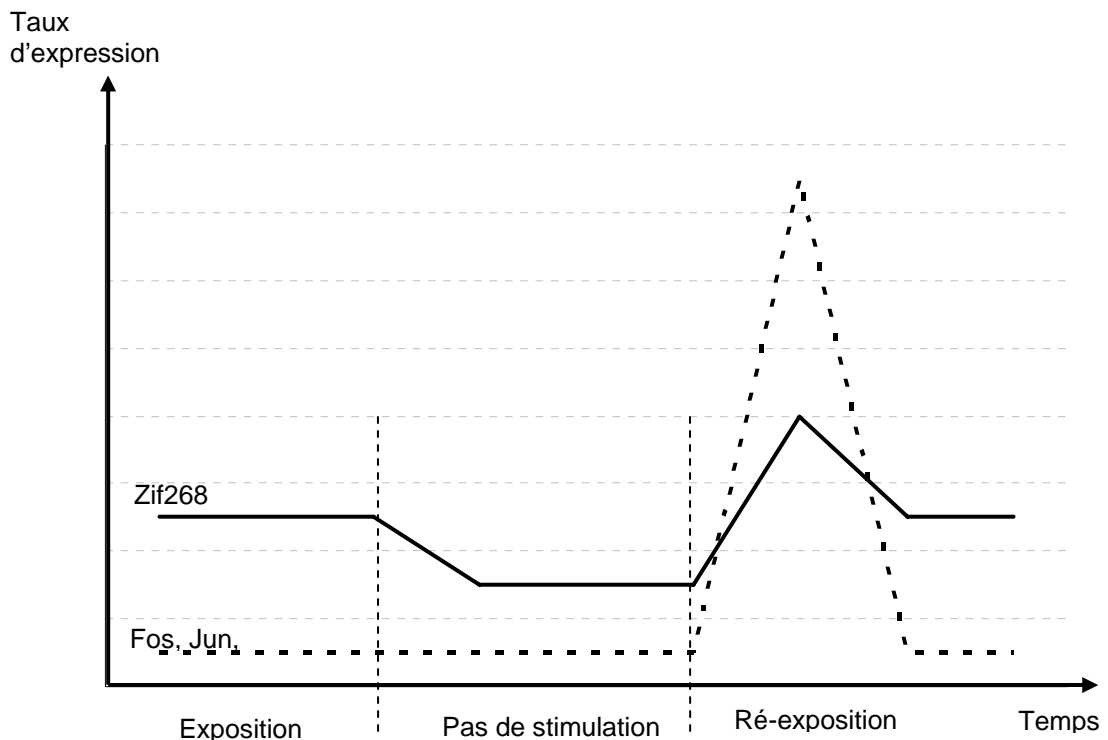


Figure 10: Profil d'expression de Fos et de Zif268 lors de la stimulation cellulaire (adapté de Kaczmarek 2000).

Les expressions de Fos et de Zif268 sont induites par une multitude de stimulations différentes : *in vitro*, application de neurotransmetteurs, de facteurs de croissance ou encore de KCl, et, *in vivo*, lésions électriques ou chimiques, induction d'une crise épileptique, administration de drogues, sevrage d'alcool ou d'opiacés et divers stress (voir les revues Herrera et Robertson 1996 ; Beckman et Wilce 1997). Comme il est illusoire de vouloir résumer les stimuli qui peuvent induire une augmentation de Fos et Zif268, il est tout autant vain d'établir un catalogue exhaustif des cibles de ces deux protéines. Néanmoins, on peut noter que les principales cibles d'action seraient:

- pour Fos :

- le gène de la préproenképhaline, un gène codant un opiacé endogène (Gall et al. 1998).
- le gène de la tyrosine hydroxylase, protéine qui permet la synthèse de dopamine.
- des gènes régulant la synthèse de glycoprotéines pré- et post-synaptiques, des protéines NCAMs et de la tubuline (Rose 1991) ; ces protéines régulent la forme du cytosquelette des neurones.

- des gènes régulant la croissance des épines dendritiques des cellules granulaires de l'Hipp (Chen et Hillman 1992).
 - pour *Zif268* (Beckman et Wilce 1997 ; Herdegen et Leah 1998) :
 - des gènes intervenant dans la formation d'enzymes intervenant à la synthèse ou la dégradation de neurotransmetteurs, par exemple l'acétylcholinestérase.
 - le gène impliqué dans la production de la sous unité 1 des récepteurs NMDA.
 - des gènes participant à la synthèse de protéines synaptiques (par exemple : synapsine I).
 - et des gènes codant des facteurs de croissance comme l'IGFII, le NGFrp, le "Neurofilament Light".

III.2. Fos et Zif268 : des marqueurs d'activité et de plasticité ?

III.2.a. Fos.

L'activation des récepteurs NMDA, impliqués dans la PLT, induit une entrée de Ca^{2+} qui augmente de façon transitoire l'expression de *c-fos* (Kaczmarek et al. 1988 ; Platenik et al. 2000). Ainsi, la quantité d'ARNm de *c-fos* s'accroît dans le GD suite à l'induction d'une PLT (Abraham et al. 1991) ; néanmoins, ceci n'est pas observé si les animaux sont anesthésiés (Douglas et al. 1988).

Chez de nombreuses espèces, la synthèse de Fos augmente après apprentissage. Chez le poulet, l'apprentissage d'une tâche d'évitement passif entraîne un accroissement rapide et spectaculaire de la quantité de *c-fos/c-jun* (Anokhin et Rose 1991 ; Freeman et Rose 1995). Cette étude montre aussi que l'expression de Fos augmente lorsque les sujets sont placés dans un nouvel environnement mais reste inchangée dans un environnement connu. Ainsi, l'induction de *c-fos* est sensible à la nouveauté. Des résultats similaires sont observés chez la Souris (Montag-Sallaz et al. 1999), ce qui suppose que les mécanismes déclenchant l'induction de *c-fos* sont conservés au cours de l'évolution. De même, chez le Rat, l'expression de l'ARNm *c-fos* augmente dans l'hippocampe lors de l'acquisition d'une tâche de discrimination (Tischmeyer et al. 1990).

Par contre, l'injection d'oligonucléotides anti *c-fos* dans l'Hipp, avant l'acquisition d'une association signal visuel/choc, réduit l'immunoréactivité de la protéine Fos dans les

régions limbiques du cerveau du rat (Grimm et al. 1997). Le blocage des ARNm *c-fos* n'empêche pas l'apprentissage mais perturbe son rappel 24h plus tard. En utilisant le même protocole lors d'un apprentissage d'une association odeur/choc, Morrow et al. (1999) observent que la micro-injection d'oligonucléotides anti *c-fos* dans l'IL et le PL perturbe le rappel de l'association lors d'un test 3 jours plus tard. La détection de l'expression de Fos a été également utilisée lors du rappel d'apprentissage de discrimination ou d'association mettant en jeu l'olfaction (Datiche et al. 2001 ; Tronel et Sara, 2002 ; Rouillet et al. 2005). Ainsi, l'activation du gène *c-fos* serait impliquée dans la formation de la mémoire à long terme (Kaczmarek 2000 ; Guzowski, 2002).

La détection de l'expression du gène *c-fos* est également très utilisée lors des expériences sur l'aversion, de la cartographie des régions impliquées dans l'AGC (Ferreira et al. 2006 ; Koh et Bernstein 2005), à l'approche fonctionnelle (Yasoshima et al. 2006 a, b). Ces nombreuses études indiquent que ce gène précoce immédiat est important pour les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de l'apprentissage de l'aversion gustative (Houpt et al. 1995 ; Lamprecht et Dudai 1996) ou de son extinction (Mickley et al. 2004) et que son expression semble être proportionnelle à la force de l'aversion (Navarro et al. 2000). Toutefois, l'expression de Fos est sensible aux différences méthodologiques utilisées pour l'établissement de l'aversion (Spray et al. 2000 ; Wilkins et al. 2006).

En outre, comme nous l'avons signalé précédemment, l'apprentissage de diverses tâches comportementales induit l'expression de *c-fos* dans différentes régions cérébrales. Ainsi, le marquage de l'expression de Fos constitue un bon outil pour l'étude des modifications de l'activité cérébrale en relation avec l'acquisition et la mémorisation de signaux olfactifs et gustatifs.

III.2.b. Zif268.

L'expression basale de Zif268 est plus élevée que celle de Fos dans de nombreuses régions du cerveau, notamment l'hippocampe (Davis et al. 2003). Comme pour Fos, l'expression de Zif268 augmente de façon rapide et robuste après induction d'une PLT, par exemple dans les cellules granulaires du GD (Cole et al. 1989 ; Wisden et al. 1990). Bien que *zif268* ne soit pas nécessaire à sa genèse, son expression est obligatoire lors de la phase tardive de la PLT et semble être corrélée avec la persistance de ce phénomène (Jones et al. 2001 ; Bozon et al. 2002). On observe ces mêmes faits dans CA1, *in vitro* et chez l'animal vigile (French et al. 2001), ainsi que dans le cortex insulaire après stimulation de l'amygdale

(Jones et al. 1999). L'expression de *zif268* paraît donc être nécessaire, au moins dans le GD, pour le maintien de la phase tardive de la PLT qui dépend de la synthèse *de novo* de protéines. Malgré ce rôle dans la plasticité synaptique, l'implication de *zif268* dans les phénomènes d'apprentissages et de rappel demeure moins étudiée que celle de *c-fos*.

Toutefois, l'expression de *Zif268* s'accroît après apprentissage d'un évitement passif (Nikolaev et al. 1992) ou d'une discrimination visuelle (Grimm et Tischmeyer 1997). Lors de l'apprentissage d'une association contexte-choc, l'expression de *Zif268* augmente dans CA1; il en est de même lors du rappel mais seulement lorsque les animaux sont remis en présence du contexte (Hall et al. 2000, 2001). Il en est de même dans l'amygdale, et ceci quelles que soient les conditions du rappel (contexte ou choc) (Malkani et Rosen 2000 ; Malkani et al. 2004). Des animaux, chez qui l'expression de ce gène est éteinte, réussissent encore à acquérir et à se rappeler une ACG, semblant indiquer un rôle mineur de *Zif268* dans ce phénomène (Yasohima et al. 2006 b). La cartographie de *Zif268* est également utilisée dans différentes tâches comportementales mettant en jeu la mémoire spatiale (Guzowski et al. 2001) ou la mémoire olfactive (Dacosta et al. 1997).

Ainsi, bien que le rôle précis de *zif268* dans les phénomènes mnésiques demeure encore mal défini, ce gène précoce immédiat n'en reste pas moins, tout comme *c-fos*, un outil intéressant pour approcher les aspects moléculaires régissant l'apprentissage et cartographier les régions cérébrales activées lors de l'acquisition et du rappel de diverses tâches.

IV- Impact du vieillissement sur le cerveau.

Le vieillissement, même non pathologique, s'accompagne souvent d'un déclin marqué des fonctions cognitives (d'apprentissage et de rappel par exemple), vraisemblablement lié aux altérations cellulaires qui modifient la plasticité cérébrale des sujets âgés.

IV.1. Neurobiologie du vieillissement.

IV.1.a. Les changements morphologiques.

Les premières investigations sur le cerveau âgé ont mis en évidence une diminution du nombre de neurones dans toutes les couches corticales (Brody 1955). Elle atteindrait 10 à 60% du nombre total de neurones, entre l'enfance et la vieillesse, ce qui expliquerait la perte de masse du tissu cérébral chez les sujets âgés. Néanmoins, l'amélioration des technologies et la mise en place de règles de stéréologie strictes ont permis de constater que la perte neuronale, bien que réelle, demeure finalement très limitée et que de nombreuses régions cérébrales comme le cortex entorhinal (Merrill et al. 2001) et l'hippocampe (Rapp et Gallagher 1996 ; Rasmussen et al. 1996 ; Burkes et Barnes 2006) ne présentent qu'une faible diminution de leur population.

Pour expliquer les difficultés cognitives chez les sujets âgés, des auteurs ont proposé qu'il existerait une modification et/ou une diminution des ramifications dendritiques des neurones pyramidaux. Néanmoins, ce type d'altération est spécifique de certaines régions et ne semble pas concerner de façon significative les arborescences dendritiques dans l'Hipp (Flood 1993 ; Pyapali et Turner 1996). On observe même que celles-ci augmentent pour les cellules granulaires chez le Rat entre 20 et 27 mois d'âge; toutefois, ces données varient selon la région hippocampique considérée (Burkes et Barnes 2006).

Même si les changements morphologiques du cerveau âgé restent mineurs, il n'en demeure pas moins que les neurones vieillissants subissent une altération de certaines de leurs propriétés électriques comme le montrent d'autres études.

IV.1.b. Modifications des propriétés biophysiques des neurones âgés.

Dans la majorité des régions hippocampiques, la plupart des propriétés électriques restent constantes durant toute la vie des animaux. Néanmoins, l'homéostasie calcique se dérègle dans les neurones âgés, en lien avec l'augmentation du nombre de canaux Ca^{2+} de Type L (Foster et Norris 1997 ; Foster 2002). Cette modification de la quantité de Ca^{2+} entrant perturbe les courants K^+ des neurones, ce qui accroît l'amplitude du potentiel de post-hyperpolarisation des régions CA1 et CA3 (Foster et Norris 1997 ; Kelly et al. 2006). Cette altération rendrait les neurones pyramidaux des animaux âgés moins excitables que ceux des jeunes. Toutefois, ces observations *in vitro*, ne se vérifient pas chez les sujets vigiles où les taux de décharges ne diffèrent pas en fonction de l'âge des animaux (Burkes et Barnes 2006).

En tant que phénomène électrique sous-tendant l'apprentissage, la PLT a fait l'objet de nombreuses études chez le sujet vieillissant. Induite avec une forte intensité de stimulation, elle n'est pas perturbée. Néanmoins, l'efficacité synaptique décroît plus rapidement chez les rats âgés que chez les jeunes (Barnes et al. 2000), ce qui pourrait être à l'origine de l'oubli d'un apprentissage spatial. En effet, lorsque des rats jeunes ou âgés apprennent à localiser l'issue d'un labyrinthe, et même si tous atteignent un niveau identique de performances, les seconds oublient plus rapidement cet apprentissage (Barnes et al. 1987). Ce résultat peut être corrélé avec la décroissance accélérée de la force synaptique observée dans les neurones âgés. Par contre, une intensité de stimulation juste liminaire ne suscite pas de PLT hippocampique chez les rats sénescents (Barnes et al. 2000). Ainsi, la PLT est plus difficile à induire et, de surcroît, disparaît plus rapidement chez les rats âgés que chez les jeunes.

Un autre phénomène rend compte de la plasticité synaptique dans les réseaux de neurones: la dépression à long terme. Cette dépression à long terme est une dépolarisation induite par des stimulations basses fréquences qui diminue l'efficacité synaptique et qui éviterait, ainsi, la saturation des neurones pyramidaux. Elle est observée *in vitro* et *in vivo* dans l'hippocampe (Lynch et al. 1977 ; Levy et Steward 1979). Lors du vieillissement, son induction est facilitée (Rosenzweig et Barnes 2003). Ainsi, chez les rats âgés, on l'observe avec des fréquences de stimulation qui restent sans effet chez les jeunes ou les adultes (Foster et Norris 1997 ; Foster 1999 et 2002).

Ainsi, chez le sujet vieillissant, la PLT, mécanisme qui serait impliqué dans le stockage de nouvelles informations, serait déficient alors que la DLT, qui traduirait, elle, les phénomènes de pertes d'informations, serait renforcée.

IV.1.c. Modifications des interactions cellulaires et des connexions entre les régions cérébrales.

Si, les modifications liées à l'âge restent relativement faibles au niveau cellulaire, l'impact du vieillissement suscite de profonds changements au niveau des relations interneuronales et des interactions entre les régions cérébrales.

Smith et al. (2000), en étudiant la répartition de la synatophysine, une protéine impliquée dans la formation des vésicules présynaptiques, montrent que le nombre de synapses actives se réduit significativement chez les animaux âgés ayant des difficultés d'apprentissage, diminution qui serait responsable de la dégradation de la voie perforante, limitant ainsi la quantité d'information qui arrive à l'hippocampe. Néanmoins, dans cette structure, les données restent encore confuses : le nombre de contacts synaptiques diminuerait dans le GD (Barnes 1979b ; Barnes et McNaughton 1980b) et les champs CA1 et CA3 (Nicholson et al. 2004), toutefois, ce résultat n'est pas retrouvé par d'autres auteurs (Nicolle et al. 1999 ; Geinisman et al. 2004) et reste à confirmer. La méthode utilisée (EPSP ou immunodétection) pour déterminer le nombre de synapses actives pourrait être, en partie, à l'origine des différences observées. En résumé, l'hypothèse la plus couramment acceptée pour expliquer les altérations qui apparaissent avec l'âge dans l'hippocampe serait la suivante: la dégradation de la voie perforante, conduisant à une diminution des messages afférents, couplée à une diminution du nombre de synapses actives, limiterait le traitement des informations et donc l'élaboration de messages efférents. Cependant, même si le nombre de contacts synaptiques diminue, cela ne perturberait pas le taux de décharge des neurones pyramidaux (Burkes et Barnes 2006). En effet, il existerait un mécanisme compensatoire au niveau des synapses encore actives : celles-ci recruteraient plus de récepteurs glutamatergiques de type AMPA pour tenter de maintenir une transmission efficace du signal (Barnes et McNaughton 1980b). Parallèlement, le nombre de récepteurs NMDA décroît chez les rats âgés, ce qui expliquerait la difficulté à établir une PLT chez ces animaux (Burkes et Barnes 2006).

Outre les modifications qui apparaissent au niveau des connexions synaptiques, il existe un dérèglement des régulations cholinergique (Gallagher et Colombo 1995 ; Shen et Barnes 1996) et dopaminergique (Hernby et al. 2003) chez les animaux âgés. Ainsi, la diminution des afférences cholinergiques agirait sur CA3 et sur la voie perforante et pourrait modérer l'influence des nouvelles informations arrivant à l'hippocampe (Hasselmo 1995). De même, la réduction des afférences modulatrices dopaminergiques perturberait l'impact des influx

partant du cortex entorhinal en direction de CA1, et les connexions entre CA3 et CA1 (Otmalkhova et Lisman 1999).

Notons que le dialogue entre l'amygdale et l'hippocampe est aussi altéré chez les rats présentant des déficits cognitifs, car bien que des stimulations de la voie perforante induisent une PLT, celles de la région amygdalienne restent sans effet (Almaguer et al. 2002).

Enfin, durant le vieillissement, on constate également des modifications neuro-endocriniennes et la baisse des œstrogènes circulants semble entraîner des altérations de la cognition (Rapp et al. 2003 ; Kelly et al. 2006).

IV.1.d. Impact du vieillissement sur la machinerie génique ?

Les effets délétères du vieillissement sur les neurones laissent supposer que, chez les animaux âgés, la machinerie génique de leurs cellules serait perturbée. Néanmoins, les observations disponibles à ce jour restent conflictuelles. En effet, chez les rats sénescents, Lee et al. (1998) montrent que, chez l'animal non stimulé, le taux d'expression de *c-fos* décroît fortement dans le cortex piriforme, le lobe temporal et les champs CA1 et CA3 mais n'est pas modifié dans le GD. Cependant, Lanahan et al. (1997) notent qu'après induction de la PLT dans l'hippocampe, les taux d'ARNm d'*Arc*, *c-jun* et *zif268* ne diffèrent pas significativement entre les rats adultes et âgés; par contre, chez ces derniers, la quantité d'ARNm *c-fos* augmente. Toutefois, Desjardins et al. (1997) signalent que l'expression de *Zif268* diminue avec l'âge des animaux alors que la quantité de *Fos* et *Jun* reste stable. De plus, l'expression de ces trois protéines ne diffère pas chez les rats âgés en fonction de leurs capacités mnésiques, normales ou déficientes.

Ainsi, bien qu'il existe des modifications de l'expression protéique dans les neurones âgés, leur nature exacte, et leurs conséquences, restent encore mal définies.

L'effet du vieillissement sur les diverses régions du cerveau reste encore peu connu car la majorité des études se concentre sur l'hippocampe, site privilégié des apprentissages spatiaux. Ce type de tâche constitue d'ailleurs le meilleur indicateur des troubles mnésiques chez les animaux.

IV.2. Modifications comportementales liées au vieillissement.

IV.2.a. Altérations des performances mnésiques et cognitives.

- Altération de la mémoire spatiale chez les animaux âgés.

Le vieillissement est associé à de nombreuses difficultés d'apprentissage et de rappel. Bien que les rats âgés soient généralement sujets à d'importantes perturbations motrices, ils restent capables d'apprendre et de retenir aussi bien que les animaux jeunes des tâches faisant appel à la mémoire procédurale (Miyagawa et al. 1998 ; Churchill et al. 2003).

La majorité des perturbations mnésiques observées provient d'expérimentations utilisant des tâches d'apprentissage spatial. Leur principe consiste à faire apprendre aux animaux la localisation d'une issue, ou d'une plateforme, dans un dispositif expérimental. L'apprentissage et le rappel de ce type de tâche est dépendant du bon fonctionnement de l'hippocampe et refléterait ainsi les altérations que subit cette structure chez les animaux âgés (Rosenzweig et Barnes 2003 ; Burkes et Barnes 2006). Les rats âgés manifestent beaucoup de difficultés lors d'un tel apprentissage, non seulement pour son acquisition mais également pour se le rappeler (Barnes 1979a, Barnes et al. 1980a). D'ailleurs, même lors d'un apprentissage dans un simple labyrinthe en T, les rats âgés ont beaucoup de mal pour apprendre à localiser la branche récompensée sur la base de repères spatiaux alors qu'ils en sont capables en utilisant une stratégie (toujours tourner à droite par exemple) (Barnes et al. 1980a ; Rapp et al. 1997).

On observe des déficits similaires lors d'un apprentissage dans un labyrinthe radial à 8 branches. Dans cette tâche, les sujets doivent se souvenir de la localisation des branches contenant des récompenses. Les rats âgés nécessitent plus de temps et plus d'essais que les jeunes et les adultes pour atteindre le critère de réussite (Gallagher et al. 1985 ; Barnes et al. 1990 ; Mizumori et al. 1996 ; Ward et al. 1999). Il en est de même chez le Singe lors d'un conditionnement similaire (Rapp et al. 1997). Dans ce type de tâche, c'est bien la mémoire spatiale qui est compromise car, si l'on soumet les rats à une version non spatiale, en différenciant les branches par des signaux tactiles, ceux qui présentent des défauts mnésiques liés à l'âge atteignent facilement le critère de réussite choisi (Barnes et al. 1987).

L'apprentissage spatial le plus utilisé reste le labyrinthe de Morris. Son but est de faire apprendre aux animaux la localisation d'une plateforme dissimulée juste sous la surface de cette piscine. Bien qu'environ 30% des rats âgés réussissent cette tâche aussi bien que des jeunes (Barnes et al. 1997), la majorité des animaux sénescents ont beaucoup de difficulté à l'acquérir (Frick et al. 1995 ; Rosenzweig et al. 1997 ; Shen et al. 1997). Il en est de même, chez l'Homme: des sujets âgés, par rapport aux jeunes, montrent également des difficultés à apprendre et à retenir des informations spatiales dans un labyrinthe virtuel (Moffat et al. 2001).

La mémoire spatiale est donc profondément altérée au cours du vieillissement. Ces perturbations résultent des modifications morphologiques, biochimiques et synaptiques de l'hippocampe vieillissant comme le démontrent les enregistrements des profils de décharges des cellules de lieu (Shen et al. 1997 ; Tanila et al. 1997). L'hypothèse la plus probable est que les problèmes de mémoire spatiale des animaux âgés seraient dus à des changements fonctionnels dans les champs CA1 où les représentations spatiales seraient moins stables et CA3 où elles seraient trop rigides (Wilson et al. 2004).

- Autres types de comportements perturbés par le vieillissement.

L'hippocampe n'est pas la seule région cérébrale où surviennent des modifications morphologiques et/ou fonctionnelles. D'autres structures sont également altérées lors du vieillissement et diverses modifications comportementales peuvent en résulter.

En effet, les rats et primates âgés apprennent plus difficilement que les jeunes une tâche d'une reconnaissance différée avec non-appariement (ou « delayed non matching to sample »), tâche dépendante du CPFm. De plus, leurs difficultés augmentent avec la durée du délai entre les essais (Dunnet et al. 1988 ; Wilig et al. 1998). Or, la capacité des animaux à accomplir cette tâche est liée au bon fonctionnement du CPFm et du cortex périrhinal, qui sont donc aussi altérés lors du vieillissement.

Il convient de remarquer que les rats âgés ont un comportement social normal et aussi riche que les sujets jeunes (Boguszewski et Zagrodzka 2002). Toutefois, leurs réactions émotionnelles semblent perturbées. En effet, comparés aux jeunes, ils sont moins mobiles dans un open-field ou se révèlent plus réticents pour explorer les branches exposées au vide d'un labyrinthe surélevé (Boguszewski et Zagrodzka 2002). Toutefois, réexposés à ce dernier environnement, ils évitent moins les branches « dangereuses » que les jeunes (Bessa et al. 2005). Lors de l'apprentissage de peur conditionnée, ils sont capables d'associer son et choc

si le délai entre les stimulations est bref (1s) mais échouent lorsqu'il augmente (20s) (McEchron et al. 2004). Cette expérience montre que les animaux âgés peuvent acquérir une association mais que leur capacité de rétention est altérée.

Des apprentissages mettant en jeu la modalité olfactive ont aussi été étudiés chez les animaux âgés. Bien que la sensibilité olfactive des rats âgés soit diminuée par rapport aux jeunes et aux adultes (Apfelbach et Weiler 1991), ils sont encore capables d'apprendre différentes formes de discrimination olfactive avec les mêmes performances que des jeunes (Kraemer et Apfelbach 2004). Dans un test de Go-NoGo, les animaux doivent apprendre qu'une seule odeur d'une paire déclenche l'arrivée d'une récompense qu'il faut aller chercher dans une autre partie du dispositif expérimental. Les rats âgés acquièrent cet apprentissage aussi bien que des jeunes mais ont beaucoup de difficultés à inverser la consigne (Schoenbaum et al. 2002). Ce déficit serait dû à une « inflexibilité » des neurones du COF. En effet, les réponses unitaires des neurones de ce cortex qui codent le changement de valeur, "récompensante" ou non, de la stimulation olfactive lors de l'inversion de l'apprentissage n'apparaissent pas chez les animaux sénescents (Schoenbaum et al. 2006). Le comportement ainsi observé chez les rats âgés est similaire à celui de jeunes rats ayant une lésion neurotoxique du COF (Schoenbaum et al. 2006).

Le vieillissement modifie donc plusieurs aspects du comportement chez les animaux ainsi que chez l'être humain. L'apprentissage et le rappel des informations spatiales restent les plus altérés, mais d'autres tâches, mettant en jeu d'autres structures comme le mPFC et le cortex périrhinal, ainsi que certaines réponses émotionnelles sont elles aussi perturbées. Toutefois, les effets du vieillissement sont complexes et ne s'exercent pas sur tous les animaux avec la même intensité puisque certaines capacités mnésiques semblent, en revanche bien conservées. En particulier, il convient de s'interroger sur le devenir de l'apprentissage et du rappel des aversions au cours du vieillissement.

IV.2.b. Vieillissement et aversion : vers une amélioration des apprentissages aversifs ?

Les études sur ce type d'apprentissage se sont limitées à l'effet du vieillissement sur l'aversion gustative conditionnée. En 1980, Ingram et Peacock ont démontré que des vieux rats mâles Fischer 344 âgés de 12 à 24 mois expriment tous une aversion pour un stimulus sapide associé à un stimulus inconditionnel pour des intervalles variables (15, 60 ou 240 min). Néanmoins, plus ce délai est grand et plus la force de l'aversion diminue chez les sujets âgés.

De plus, ceux-ci sont moins résistants à l'extinction de l'aversion gustative que les rats adultes. De même, des rattes Wistar très âgées expriment une aversion, pour un stimulus gustatif, soit forte si l'IS est nul, soit faible s'il est long (3h) (Hinderliter et Misanin 1993, 1995). Signalons enfin que si les jeunes rats sont sensibles à une modification du contexte lors de l'apprentissage de l'AGC ce n'est pas le cas des sujets âgés (Misanin et al. 1997). Ainsi, semblent plus résistants aux phénomènes de perturbations qui peuvent interférer avec cet apprentissage.

Les rats âgés sont donc capables d'apprendre une AGC même avec de longs IS (figure 11). Alors que les animaux jeunes et adultes (de 0.25 à 1.5 ans) ne sont plus capables d'apprendre l'AGC quand l'IS est supérieur à 180 min, les rats sénescents expriment encore une aversion (Misanin et al. 2002a). Ainsi, l'AGC serait donc un processus qui se renforce au cours du vieillissement.

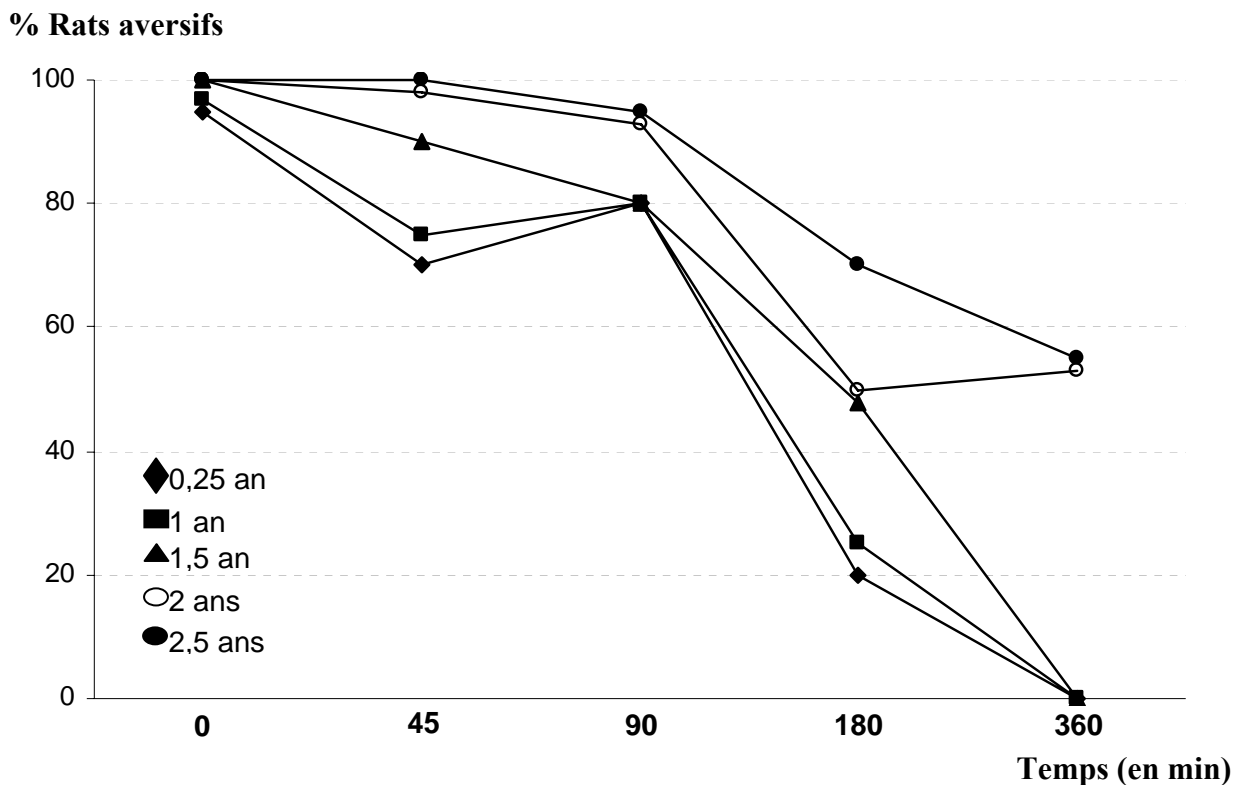


Figure 11: Pourcentage de rats aversifs en fonction de leur âge et de l'IS (adapté d'après Misanin et al. 2002b).

Dans ce chapitre nous avons noté que le vieillissement non pathologique entraîne des altérations mnésiques profondes, complexes et de plusieurs ordres. Au niveau microscopique, il s'agit de modifications moléculaires et de perturbations de la machinerie intrinsèque des neurones entraînant des changements des connexions synaptiques et des propriétés électrophysiologiques. Au niveau comportemental, elles se traduisent par une diminution des diverses capacités mnésiques chez les sujets âgés. La mémoire spatiale est la plus affectée reflétant ainsi la dégradation subie par l'hippocampe. Toutefois, certains comportements sont faiblement perturbés par la sénescence car les régions cérébrales sont différenciellement modifiées par le vieillissement, Ainsi, la mémoire procédurale, la mémoire olfactive et celle mise en jeu dans des événements aversifs (gustative principalement) semblent peu détériorées, voire améliorées pour cette dernière.

∞POSITION DU PROBLEME∞

Comme nous l'avons présenté dans l'introduction, les apprentissages aversifs tiennent une place importante dans l'établissement du comportement alimentaire. Ils peuvent être divisés en trois types: l'aversion gustative conditionnée, l'aversion olfactive conditionnée et l'aversion olfactive potentialisée par le goût. Alors que la première s'apprend facilement la seconde est relativement difficile à établir car elle requiert un IS court. En revanche, la troisième, l'AOPG, est un apprentissage original puisqu'il dépend de la mise en jeu de deux modalités sensorielles, gustation et olfaction. La potentialisation consiste alors en un renforcement de l'aversion pour l'odeur (signal distal) par la présentation du goût (signal proximal). Ainsi, l'AOPG est un apprentissage « écologiquement » pertinent car il permet à l'animal d'éviter toute ingestion ultérieure d'un aliment dangereux via une détection à distance. Nous avons vu aussi que les apprentissages aversifs sont particulièrement robustes. Cependant, il est connu qu'avec l'âge, des modifications de l'apprentissage et de la mémoire s'installent progressivement qui pourraient peut-être interférer avec le rappel de l'aversion.

L'AGC reste le phénomène aversif le plus étudié car facile à induire; ainsi les structures cérébrales impliquées dans son apprentissage et son rappel sont de mieux en mieux connues. Au contraire, celles sous-tendant l'AOPG ne sont pas clairement identifiées. En effet, les données de la littérature concernent surtout des approches lésionnelles ou pharmacologiques ainsi que des inactivations sélectives de certaines régions du cerveau et portent, pour l'essentiel, sur l'acquisition de cette aversion. Par contre, il n'existe pas de « cartes » des régions cérébrales activées lorsque l'animal est confronté à un stimulus ayant acquis une valeur aversive.

Dans ce travail, nous nous sommes donc interrogés sur la nature des réseaux neuronaux qui sous-tendent le rappel de l'AOPG. Nous avons entrepris de déterminer les patterns d'activation cérébrale mis en jeu lors du rappel de l'AOPG. Pour ce faire, nous avons décidé de répondre à trois questions complémentaires:

- 1) l'AOPG est-elle un phénomène "unique" qui, quel que soit le stimulus utilisé pour son rappel, met en jeu les mêmes aires cérébrales ou bien le pattern d'activation observé est-il directement dépendant de la voie sensorielle, olfactive ou gustative, sollicitée lors de ce rappel ? Pour répondre à cette question, nous avons comparé les motifs d'activation engendrés par la présentation de l'odeur ou de la saveur lors du rappel de l'AOPG et avons focalisé notre analyse sur un certain nombre de structures télencéphaliques

connues pour leur rôle dans le traitement des informations olfactives ou gustatives, ou dans l'intégration multi-sensorielle, et pour leur implication dans les processus mnésiques. Nous avons donc examiné les réseaux activés lors du rappel de l'AOPG évoqués par la présentation soit de l'odeur, soit du goût.

- 2) L'altération éventuelle de l'apprentissage et du rappel de l'AOPG au cours du vieillissement reflètent-ils des troubles mnésiques généralisés ou sont-ils caractéristiques de cette aversion? Pour répondre à cette question, nous avons mené une approche comportementale afin de déterminer, chez des rats jeunes, adultes et âgés, si cette aversion est bien acquise puis mémorisée et quelle est sa force lors du rappel. A l'évidence, il était nécessaire d'évaluer les capacités mnésiques de nos sujets: en effet, si les animaux présentent un déficit dans le rappel de l'AOPG, celui-ci pourrait être non spécifique de ce conditionnement mais refléter une altération générale des processus mnésiques. Nous avons donc, préalablement au test de l'AOPG, soumis nos animaux à trois tâches comportementales permettant respectivement d'évaluer leur capacités attentionnelles et ainsi que leur mémoire à court terme, leur mémoire à long terme dans une tâche de discrimination olfactive et une tâche spatiale (retour au gîte). Ainsi, les résultats obtenus au test de l'AOPG peuvent être, pour chaque sujet, comparés à ses capacités mnésiques plus générales.
- 3) Ce point établi, la question se posait de déterminer si les réseaux neuronaux mis en jeu lors du rappel de l'AOPG étaient identiques, ou non, au cours de la vie de l'animal ? Pour ce faire, nous avons comparé les patterns d'activation obtenus, pour l'odeur et pour la saveur, chez les trois groupes de rats considérés.

Avant de débiter ces travaux qui, comme toutes les études longitudinales posent un certain nombre de contraintes, nous avons tout d'abord défini quels facteurs permettraient d'obtenir des conditions optimales d'établissement de l'aversion. Ainsi, nous avons examiné l'impact de la souche de rat et de la nature du stimulus olfactif sur l'expression de l'AOPG. Nous avons donc comparé l'influence de l'odeur de géranol ou de benzaldéhyde sur la capacité des rats Wistar ou Sprague-Dawley à acquérir et se rappeler d'une AOPG.

Du point de vue méthodologique, nous avons décidé d'associer systématiquement une approche comportementale à une approche immunocytochimique. Nous avons cartographié l'activation cérébrale via la détection immunohistochimique de l'expression des protéines Fos et Zif268, marqueurs de l'activité et de la plasticité cérébrale, pour répondre à ces différentes questions.

⌘ Matériel et Méthodes ⌘

I. Animaux.

Nous avons utilisé deux espèces de rats pour nos expériences. Pour la mise au point du protocole de l'AOPG, nous avons utilisé des rats Wistar IOPS d'un poids de 220-250g de l'élevage Janvier (France).

Pour l'expérience longitudinale du rappel de l'AOPG, nous avons eu recours à des rats Sprague Dawley OFA provenant, en majeure partie, de l'élevage Charles River (France):

- des jeunes, expédiés juste sevrés, âgés de 1,5 mois au début des expériences et pesant entre 50 et 70g.
- des adultes, âgés de 12 à 13 mois et d'un poids de 430 à 510g à leur arrivée au laboratoire.
- et des sénescents, âgés de 20 à 24 mois au début des expériences et pesant entre 585 et 620g. Notons que ce groupe inclut aussi des rats Sprague Dawley de 24 mois provenant de l'élevage Harlan (France).

Les effectifs pour chaque âge sont indiqués dans le tableau 3. Dès leur arrivée au laboratoire, nous plaçons les animaux dans des cages d'habitation individuelles en polypropylène dont la taille est adaptée au poids des rats: pour les jeunes, 42 x 21 x 18cm, pour les adultes et les sénescents, 42 x 42 x 18cm.

Les animaux résident dans une pièce de l'animalerie qui leur est réservée. Cette pièce est maintenue à une température constante de 21° C et à un taux d'hygrométrie de 55%. Le cycle jour/nuit est de 12h (7/19h).

Pendant la première semaine qui suit leur arrivée, les rats accèdent librement à la nourriture et à l'eau. Nous les pesons et les manipulons tous au moins cinq minutes tous les jours afin de les habituer à l'expérimentateur et de diminuer leur stress.

Tous les animaux sont traités en accord avec la directive du 24 Novembre 1986 (86/609/EEC) de la Communauté Européenne.

A

Âge	Effectif	Effectif total
Rats jeunes		
1,5 mois	49	49
Rats adultes		
12 mois	15	24
13 mois	9	
Rats sénescents		
20 mois	9	25
21 mois	2	
22 mois	2	
23 mois	2	
24 mois	10	

B



Tâche Âge	Reconnaissance d'objets	Discrimination olfactive	Tâche de retour au gîte	Aversion olfactive potentialisée par le goût	Contrôle de base de l'expression de Fos et Zif268
Jeunes	17	43	16	45	4
Adultes	9	9	9	20	4
Sénescents	8	23	22	19	6

Tableau 3: Effectifs pour chaque âge étudié (A) et pour chacune des tâches comportementales auxquelles sont soumis les trois groupes d'âge (B).

II. Les Tests Comportementaux.

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, le vieillissement s'accompagne de modifications des capacités mnésiques, ainsi, avant de soumettre les animaux à l'acquisition puis au rappel de la TPOA, il est nécessaire de déterminer si les animaux présentent des capacités d'apprentissage et de rappel intactes ou altérées. Dans ce but, nous avons utilisé une approche comportementale (Figure 12) qui se compose de trois tâches : reconnaissance d'objets, discrimination olfactive et spatiale. Ces trois situations différentes d'apprentissage vont nous permettre d'estimer diverses capacités cognitives des rats.

Figure 12: Mise en place des protocoles comportementaux.

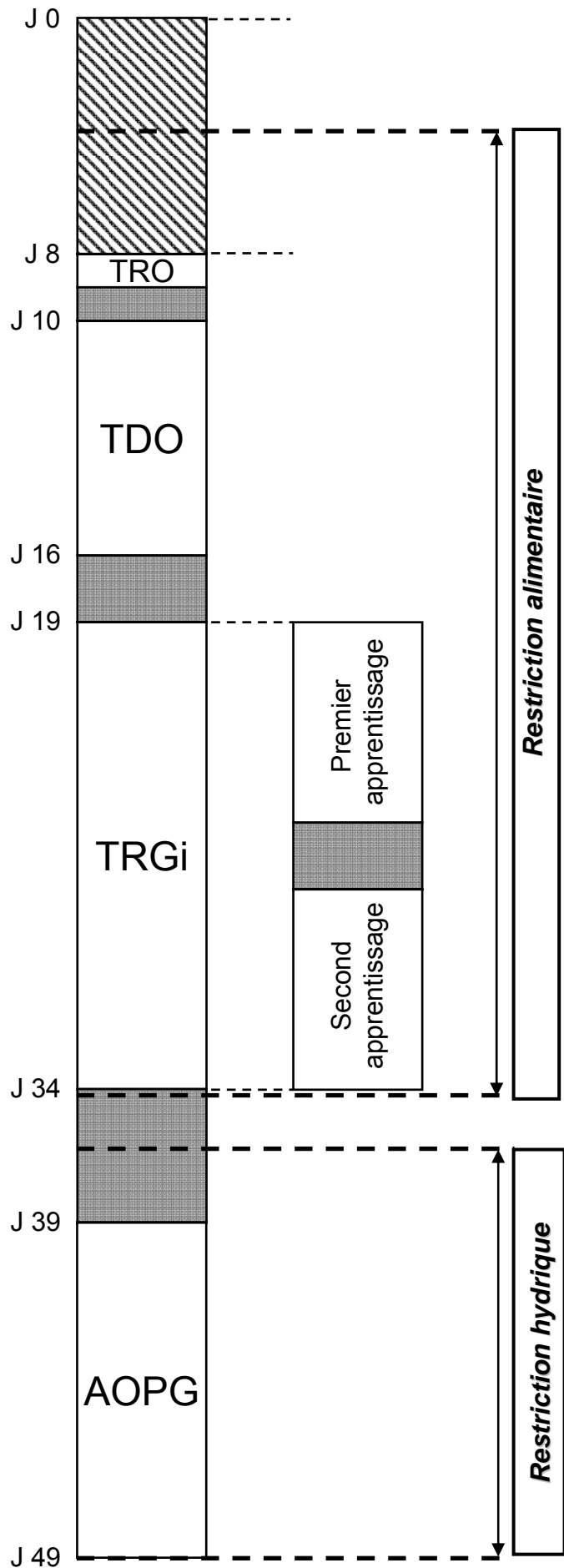
-  Acclimatation à l'animalerie et à l'expérimentateur
-  Repos

TRO: tâche de reconnaissance d'objet.

TDO: tâche de discrimination olfactive

TRGi: tâche de retour au gîte.

AOPG: aversion olfactive potentialisée par le goût.



II.1. Reconnaissance d'objet : préférence pour un nouvel objet.

II.1.a. Principe.

Cette tâche, développée par Ennaceur et Delacour (1988), est basée sur la tendance naturelle des rongeurs à explorer préférentiellement un nouvel objet par rapport à un objet familier. Elle permet de tester les animaux sans habituation préalable au contexte expérimental et ne nécessite pas l'utilisation de renforcement positif et/ou négatif, d'où un faible stress. Le fait de placer l'animal dans un nouvel environnement suffit à déclencher un éveil attentionnel qui se traduit par une exploration intensive. La préférence pour un nouvel objet (PNO) nous permet d'estimer si la mémoire à court-terme est altérée et aussi de vérifier les capacités exploratoires et motrices des animaux.

II.1.b. Protocole et dispositif expérimental.

La PNO se déroule une semaine après l'arrivée des sujets au laboratoire. Nous plaçons les rats dans une boîte en bois laqué noir adaptée à la taille des animaux (64 x 64 x 30 cm pour le groupe jeune et 84 x 84 x 62 cm pour les groupes adulte et sénescents).

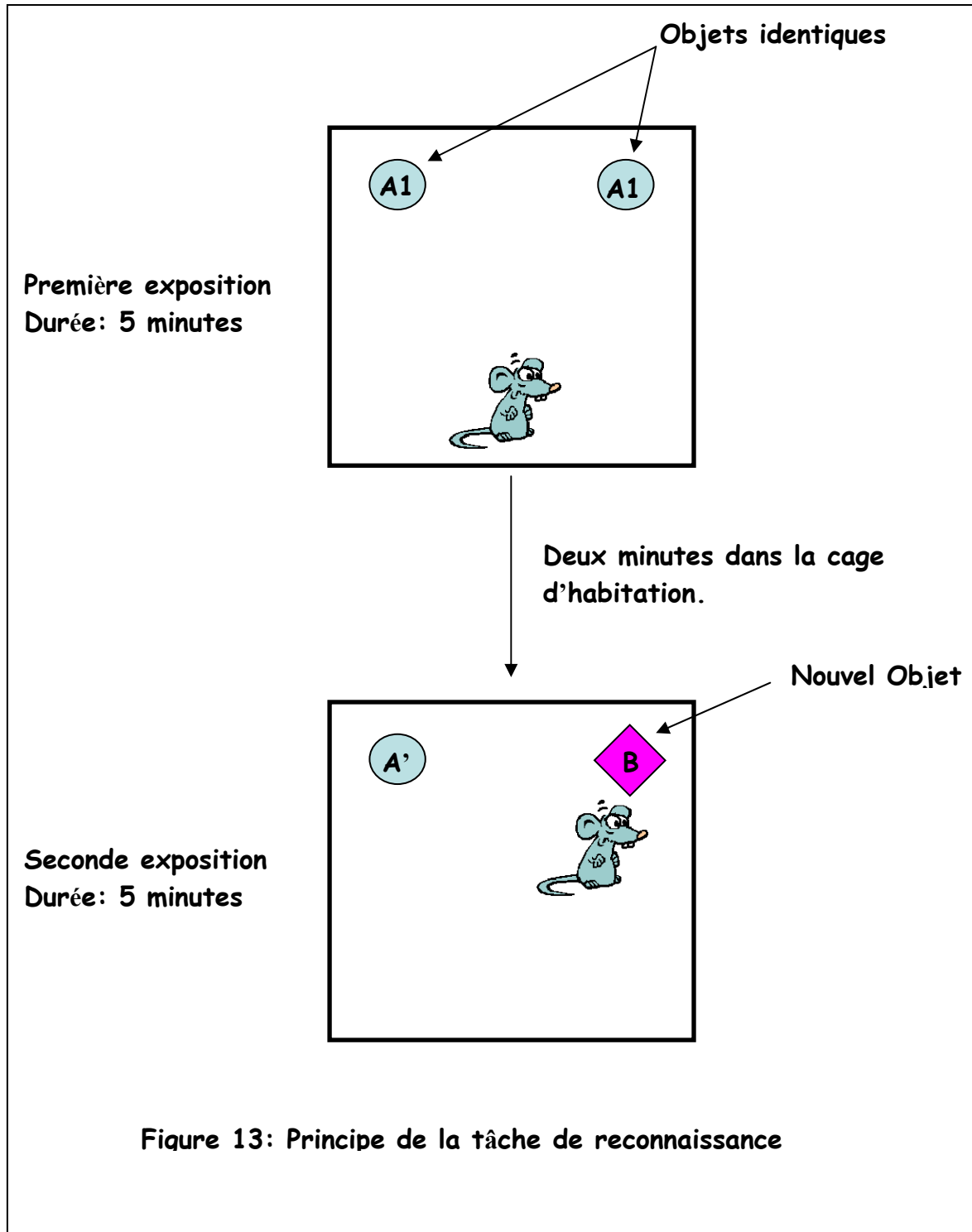
Les animaux effectuent un premier passage dans cette boîte où nous avons placé deux cylindres identiques de couleur grise (Figure 13). Ces objets sont appelés A1 (celui à gauche) et A1' (celui à droite). Les animaux sont ensuite retirés de cet environnement et restent deux minutes dans leur cage d'habitation. Après ce délai, nous réintroduisons les rats dans la boîte. Cette fois les animaux sont en présence d'un objet identique aux deux précédents (appelé A'') et d'un nouvel objet : une pyramide en plastique de couleur fuschia (appelé B). Chaque test dure 5 minutes.

II.1.c. Analyse.

Dans cette tâche comportementale, nous mesurons l'activité exploratoire des animaux lorsqu'ils sont confrontés à une modification d'un environnement déjà exploré. Nous analysons les variables suivantes :

- le temps d'exploration total (T). Cet indice (en secondes) correspond au temps total d'exploration active (locomotion, redressements sur les pattes postérieures, flairage) de l'animal dans l'enceinte et des deux objets, lors de chaque exposition: T1 pour la première et T2 pour la seconde.

- les temps d'exploration de chaque objet correspondent au temps d'exploration active et de flairage des deux objets identiques lors de la première exposition (A1 et A1') et des deux objets différents lors de la seconde (A'' et B).



II.2. La tâche de discrimination olfactive.

Cette tâche est adaptée de celle mise au point par S. Sara et collaborateurs (Sara et al. 1999, Tronel et Sara 2002).

II.2.a. Principe.

La tâche de discrimination olfactive (TDO) est un apprentissage dans lequel les rats, doivent associer une odeur avec une récompense alimentaire. Le rat doit discriminer entre trois odeurs dont une seule, toujours la même, est associée à la récompense.

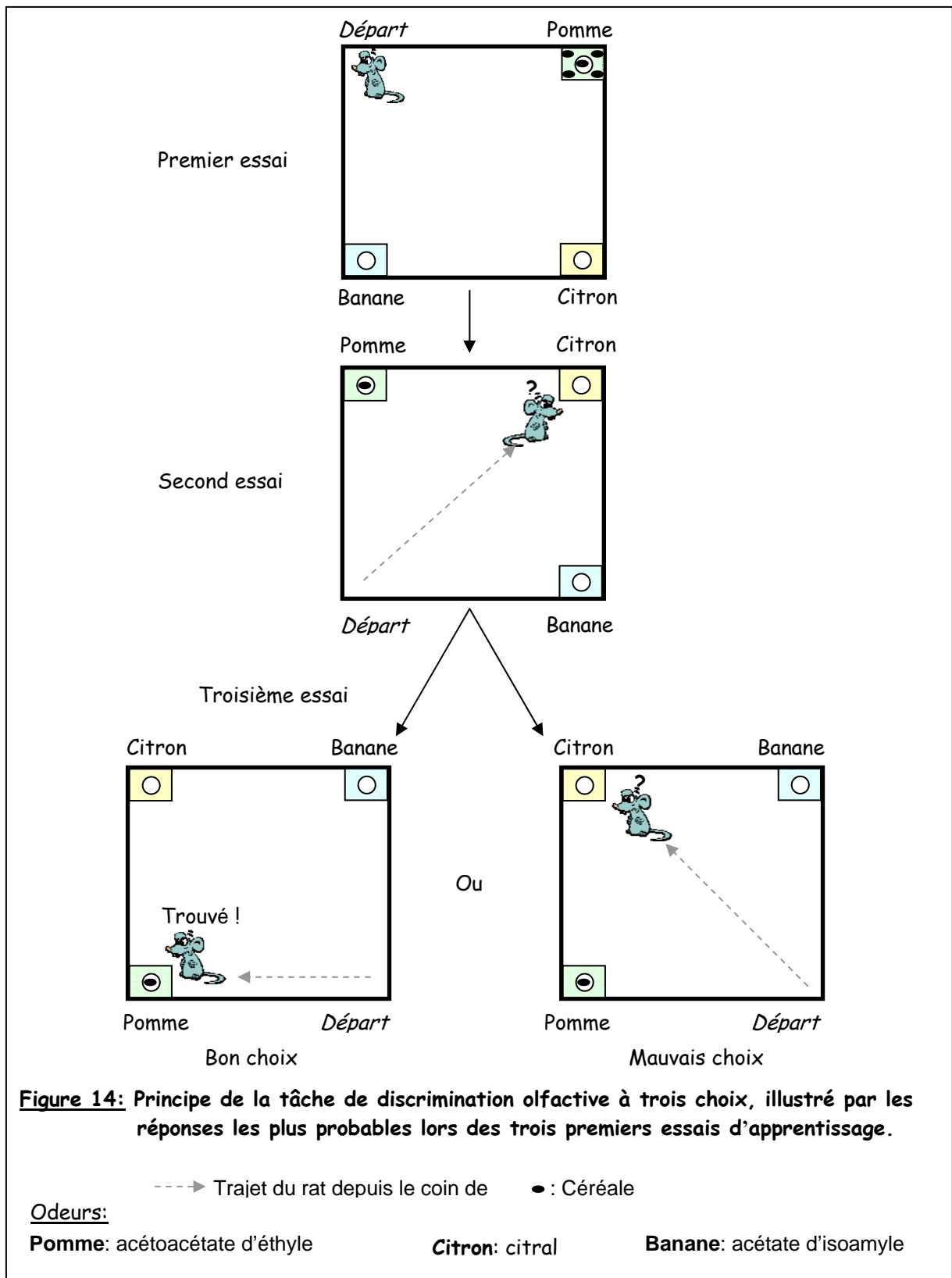
II.2.b. Protocole.

Nous plaçons les animaux en restriction alimentaire. Nous leur donnons une quantité de nourriture (déterminée pour chaque animal) qui leur permet de maintenir leur poids à 80% de son poids initial. Ainsi, l'animal est motivé pour chercher et consommer la récompense alimentaire présente dans le dispositif expérimental.

Suit une phase d'habituation au dispositif: pendant 3 jours, nous introduisons quotidiennement chaque rat pendant 10 minutes dans l'enceinte expérimentale vide, à l'exception de quelques récompenses alimentaires dispersées sur le sol, afin qu'il se familiarise avec le dispositif d'une part, et avec cet aliment inhabituel pour éviter une réaction de néophobie.

La phase d'apprentissage se compose de quatre sessions maximum, à raison d'une session par jour. Chaque session comprend 5 essais. Un essai se déroule de la façon suivante (Figure 14):

- Nous plaçons une éponge, percée en son centre, dans trois coins de la boîte expérimentale. Sur chacune d'elles, nous déposons un peu de solution odorante il s'agit, de l'acétate d'isoamyle (odeur de banane), de l'acétoacétate d'éthyle (odeur de pomme) et du citral (odeur de citron). Quelques céréales sont placées dans l'éponge sentant la pomme, qui est l'odeur associée à la récompense.
- Nous déposons le rat dans le coin sans éponge, la tête dirigée vers la paroi de la boîte. Il dispose alors d'un temps limité pour trouver la récompense (cf. tableau 4).



- lorsque le rat a trouvé la récompense, ou que le temps imparti pour l'essai est arrivé à son terme, nous retirons l'animal de l'enceinte et le plaçons dans sa cage d'habitation pendant deux minutes.
- Pendant ce temps, l'enceinte est alors rapidement lavée, et la disposition des éponges modifiée.
- Au terme du délai de 2 min, nous remplaçons le sujet dans l'enceinte pour l'essai suivant.

Essais	Durée (min)
1	7
2	5
3	3
4	1
5	1

Tableau 4 : Durée Maximale des essais lors d'une session de conditionnement.

Remarquons que le premier essai de la première session de conditionnement diffère des suivants. En effet, pour que l'animal comprenne mieux la tâche demandée nous plaçons une récompense aux quatre coins de l'éponge portant l'odeur de pomme. Lors des essais suivants, les céréales ne sont localisées que dans le trou central de l'éponge.

Nous considérons que l'animal a appris lorsqu'il atteint un score de réussite supérieur ou égal à 80% pour une session et qu'un essai est réussi lorsque le rat va prendre une céréale dans l'éponge "récompensée" sans faire d'erreur(s). En revanche, si l'animal n'atteint pas ce critère au bout des quatre sessions, nous considérons qu'il n'a pas appris la tâche. Lorsque les animaux atteignent le critère de réussite, nous les laissons au repos pendant 48h dans leur cage d'habitation.

Après ce délai, nous procédons au test de rétention qui consiste en un essai non renforcé. Ce test nous permet de contrôler si l'animal a bien appris l'association odeur-renforcement spécifique et non pas simplement la présence de nourriture dans l'une des trois éponges.

II.2.c. Dispositif expérimental.

L'apprentissage et le rappel de la TDO sont réalisés dans une boîte carrée en bois laqué noir dont les dimensions sont adaptées à la taille des sujets:

- pour les jeunes : 64 x 64 x 30 cm
- et pour les adultes et rats sénescents : 84 x 84 x 62 cm.

Trois petites éponges (8 x 6 x 3 cm) dotées de trou (2 cm de diamètre) d'une profondeur de 3 cm en leur centre, sont disposées à trois coins des boîtes expérimentales. La récompense consiste en trois céréales chocolatées (Céréales Crunch, Nestlé, France) placées au centre de l'éponge, odorisée par l'acétoacétate d'éthyle, de façon à ce qu'elles ne soient pas visibles par le rat. Pour que l'animal accède à cette récompense, il doit faire un « nosepoke », c'est-à-dire plonger sa tête dans le trou central de l'éponge et prendre une céréale. Chaque éponge est odorisée avec 16µL de la solution odorante choisie. Nous utilisons les odeurs suivantes: acétate d'isoamyle (Sigma), citral (Sigma) et acéto-acétate d'éthyle (Fluka). Toutes les solutions sont diluées au 1/5 dans de l'huile minérale (Sigma).

II.2.d. Analyse.

Pour chaque animal nous prenons en compte trois critères: le nombre d'essais nécessaires pour apprendre l'association, la latence et le nombre d'erreurs de référence. La latence correspond au temps que met l'animal pour faire le nosepoke dans l'éponge associée à la récompense. Une erreur de référence consiste en un "nosepoke" du rat dans une éponge sans récompense.

II.3. La tâche de retour au gîte.

Cette tâche a été adaptée à partir de celle mise au point par Rossier et Schenk. (2003). La tâche de retour au gîte (TRGi) est une adaptation de l'apprentissage spatial développé par Barnes (« Barnes circular platform », 1979a).

II.3.a. Principe.

Cette tâche se base sur la tendance naturelle du rat à fuir, le plus rapidement possible, un lieu potentiellement dangereux. Les animaux sont placés dans une enceinte circulaire normalement éclairée et comportant cinq issues dissimulées sous des caches de même couleur que le revêtement du sol. L'animal doit apprendre que l'une d'entre elles lui permet de s'échapper du dispositif et d'accéder à une cage sans lumière où se trouve une récompense (céréale). Le rat doit donc utiliser des signaux spatiaux pour se repérer et localiser la sortie.

II.3.b. Protocole.

Les rats, à la suite de la tâche de discrimination olfactive, restent placés en restriction alimentaire.

Avant de commencer l'apprentissage proprement dit, une période d'habituation de trois jours permet de familiariser les rats au dispositif de la TRGi. Durant ces trois sessions, nous plaçons les animaux dans un dispositif similaire à celui de la TRGi mais plus petit (60cm de diamètre) et équipé d'une seule sortie. Celle-ci, d'abord entièrement dégagée, est progressivement recouverte par un cache à chaque essai. Cette phase permet à l'animal de comprendre que, pour sortir du dispositif, il doit soulever un cache qui dissimule l'issue.

Après l'habituation, le premier apprentissage commence (Figure 15A). La phase d'apprentissage se compose de quatre sessions maximum, à raison d'une session par jour. Chaque session comprend 5 essais. Un essai se déroule de la façon suivante :

- le rat est placé dans l'enceinte expérimentale, dans sa zone de départ (figure 15A).
- il dispose de cinq minutes pour trouver la sortie. S'il ne la trouve pas dans le temps imparti, on le guide avec précaution vers elle.
- quand l'animal a consommé la récompense, nous le remplaçons dans sa cage d'habitation pendant deux minutes. Pendant ce temps, l'expérimentateur nettoie rapidement le dispositif et fait tourner la table d'une rotation de $n \times 72^\circ$ (n allant de 1 à 5, cf. figure 15A).

Nous considérons que l'animal a appris la TRGi lorsqu'il réussit à atteindre 60% de choix corrects lors d'une session. Le rat fait un choix correct lorsqu'il soulève, dans le temps imparti, le cache obstruant la sortie sans faire d'erreur. Quarante huit heures après que le rat a atteint ce critère, nous mettons en place une session de test. Celle-ci se déroule de la même façon qu'un essai normal, à ceci près que toutes les issues sont bouchées, ce qui permet de vérifier que l'animal a bien appris à localiser la sortie grâce aux repères spatiaux et non pas grâce aux odeurs qui pourraient éventuellement émaner de la cage placée sous le dispositif. Dès que le rat soulève le bon cache, nous le remplaçons dans sa cage d'habitation et lui donnons une récompense.

Ce premier apprentissage achevé, nous soumettons le rat au second apprentissage qui comporte lui aussi quatre sessions quotidiennes au maximum. Pour celui-ci, nous modifions (figure 15B) la localisation de la sortie tout en gardant les mêmes indices visuels que pour le premier apprentissage. Le rat subit cinq essais par jour jusqu'à ce qu'il atteigne de nouveau un score de réussite de 60%.

Quand cet apprentissage est terminé les animaux reçoivent de la nourriture *ad libitum*.

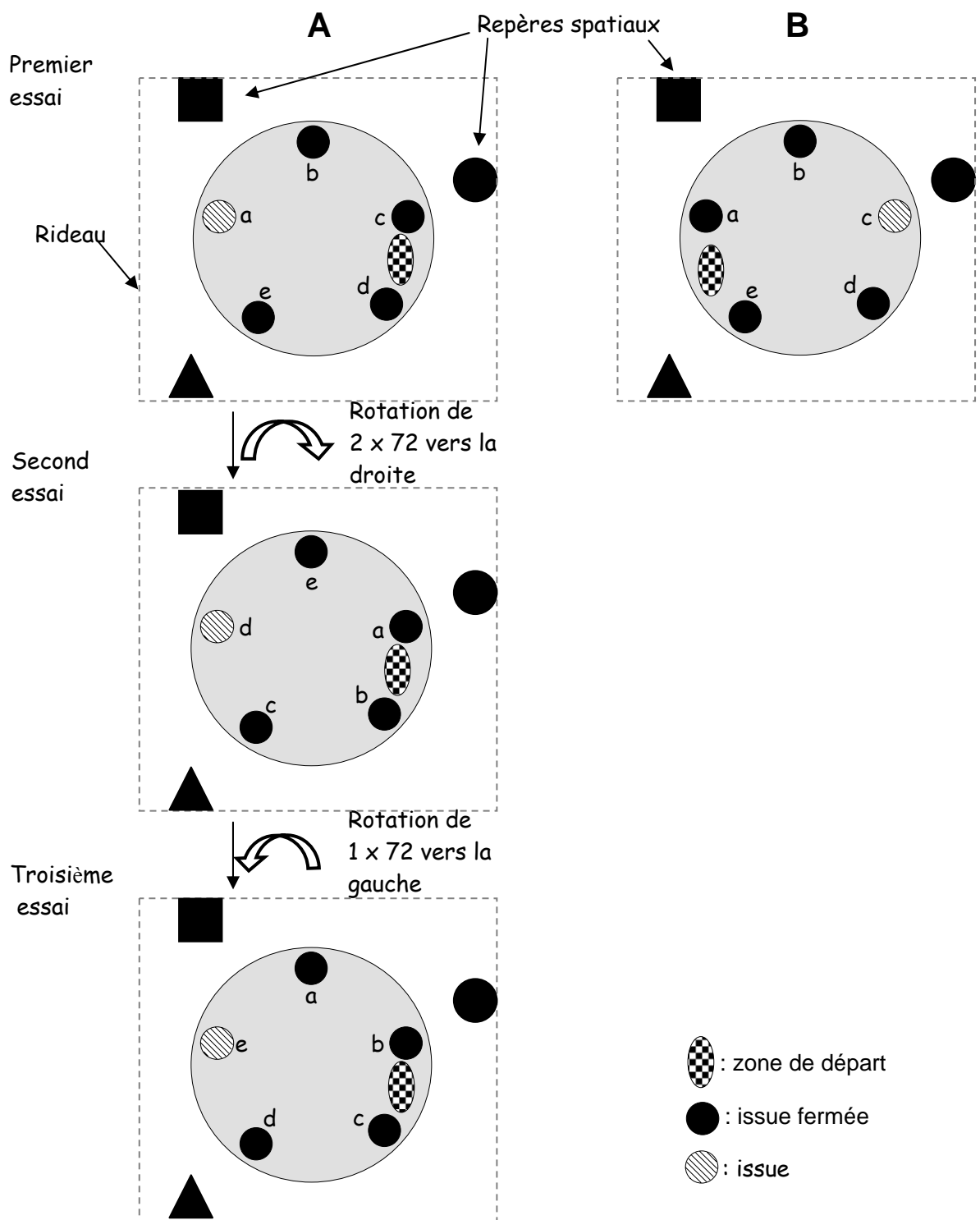


Figure 15: A: Exemples de rotations de l'enceinte lors d'essais successifs pour le premier apprentissage. B: Localisation de la sortie lors du second apprentissage.

II.3.c. Dispositif expérimental.

Pour la TRGi, nous utilisons une plateforme circulaire de 165 cm de diamètre, située à 125 cm au dessus du sol et limitée par une bordure de 15 cm de haut (Annexe 1). Dans le sol de cette enceinte, nous avons percé cinq orifices (de 10,5 cm de diamètre) espacés régulièrement d'un angle de 72°. Sous chacun, un tube en plastique (de 10 cm de diamètre et de 15 cm de longueur) permet au rat de gagner une cage placée sous le dispositif expérimental. Chaque orifice peut être dissimulé par un cache (d'un diamètre de 12 cm) de même matière que le sol.

Un dispositif mécanique permet de modifier l'orientation de la plateforme par rotation, ce qui présente l'avantage d'interdire aux rats de se repérer dans l'enceinte en utilisant des traces olfactives résultant d'un précédent essai. Des portants métalliques, (200 x 200 x 200 cm) auxquels nous suspendons des rideaux noirs, entourent, l'enceinte qui se trouve ainsi isolée de la salle d'expérimentation, et servent de support pour les signaux visuels (Annexe 1). Enfin, un éclairage direct, placé au dessus, permet d'exposer le dispositif à une lumière homogène.

II.3.d. Analyse.

Pour chaque animal, nous prenons en compte les trois critères suivants : le nombre d'essais nécessaires pour apprendre à localiser la sortie, la latence et le nombre d'erreurs de référence. La latence correspond au temps que met l'animal pour trouver la sortie. Nous considérons comme erreur de référence le fait que le rat soulève un cache recouvrant un orifice bouché et donc se trompe de sortie.

III. L'aversion olfactive potentialisée par le goût.

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, l'AOPG est un apprentissage aversif particulier. Pour son établissement et son rappel nous avons mis au point un protocole particulier et développé un dispositif expérimental spécifique, les lickomètres.

IV.1. Dispositif expérimental.

L'apprentissage et le rappel de l'AOPG se déroulent dans des cages spécialement conçues au laboratoire: les lickomètres, permettant d'enregistrer les lapements de l'animal (Figure 16).

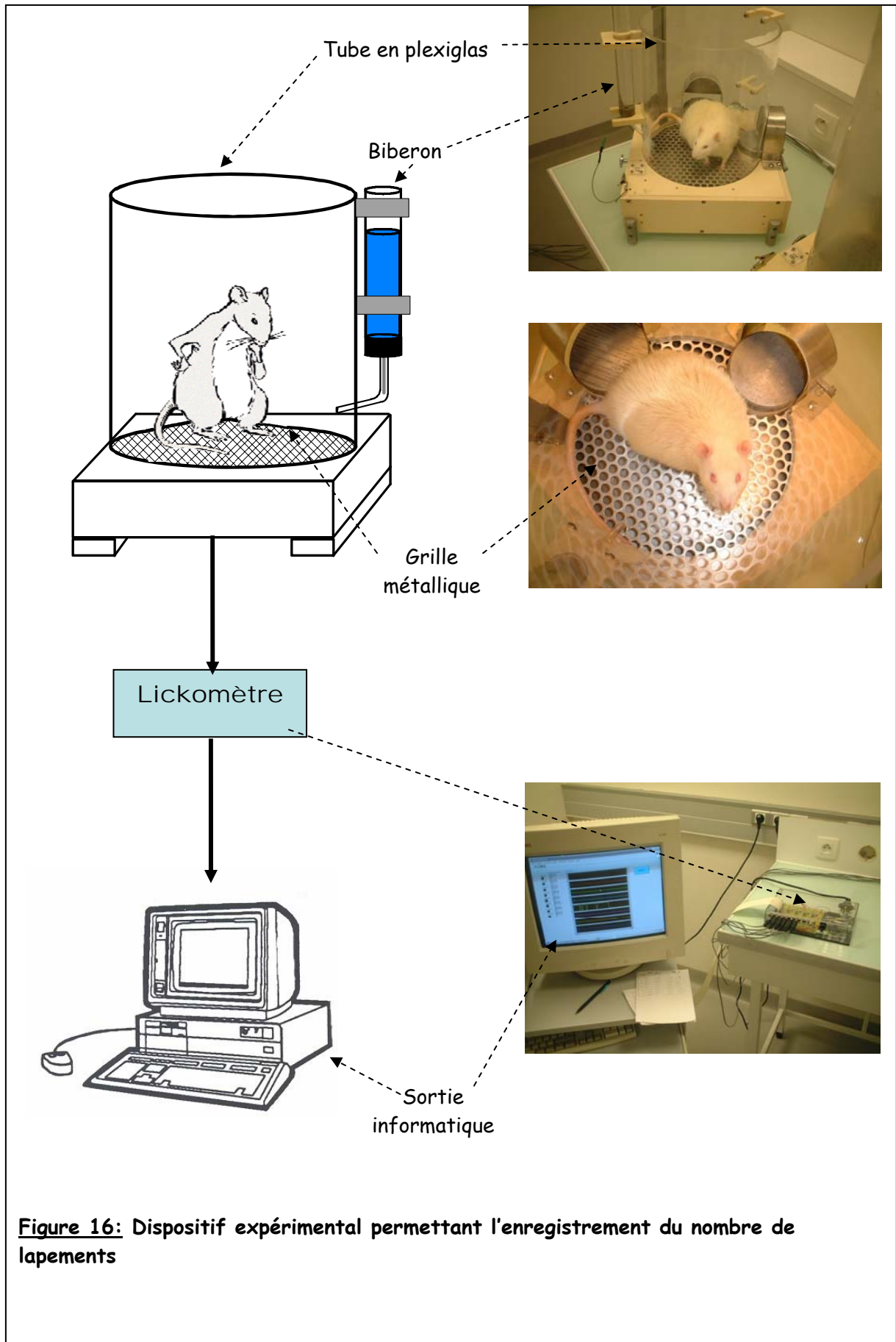
La cage, constituée d'un cylindre en Plexiglas qui permet d'observer le comportement de l'animal, présente une base en plastique recouverte d'une grille métallique. Un tube en verre, fermé par un bouchon en plastique laissant passer une fine tubulure en verre coudée qui entre dans la cage, sert de biberon. Un fil en argent placé dans ce biberon et la grille métallique sont connectés à un boîtier électronique. Celui-ci permet de détecter chaque contact de la langue de l'animal avec l'eau contenue dans le tube de boisson. Le signal est transmis sur un ordinateur qui va permettre de suivre le nombre de lapements en temps réel (interface Labview). Le nombre de lapements peut être enregistré et stocké pour chaque sujet afin d'être ensuite analysé.

IV.2. Protocole.

Les rats sont d'abord placés en restriction hydrique: les biberons sont retirés des cages d'habitation et les animaux n'ont accès à l'eau que dix minutes par jour pendant deux jours.

A partir du troisième jour, les animaux sont soumis au protocole de l'AOPG qui se décompose en quatre phases :

- **Phase d'habituation:** les rats sont introduits dans les lickomètres pour les habituer au contexte expérimental (salle d'expérimentation et lickomètres). Ils ont alors accès pendant dix minutes chaque jour à l'eau contenue dans le biberon du dispositif. Un papier filtre non odorisé entoure l'embout du tube de boisson à 1,5 cm de son extrémité. Les sujets apprennent à effectuer la totalité de leur prise



d'eau quotidienne pendant ce laps de temps. Lorsque la consommation des animaux est devenue stable, on procède à la session d'acquisition.

- **Phase d'acquisition:** une solution de la saccharine (0,1%, Sigma) remplace l'eau du biberon et nous déposons sur le papier filtre proche de l'embout 5 μ L d'une solution de benzaldéhyde (Sigma) diluée au 1/5 dans de l'huile minérale. Ainsi, nous présentons aux rats deux stimuli conditionnels (SC) simultanément: un goût sucré et l'odeur d'amande amère. Nous avons choisi ces deux composés car la saccharine n'entraîne pas d'effet métabolique après son ingestion et que l'odeur libérée par le benzaldéhyde stimule le système olfactif, sans composante trigéminal. Comme les jours précédents, le rat dispose de dix minutes pour boire, puis nous le remplaçons dans sa salle d'habitation. Trente minutes plus tard, nous injectons par voie i.p. soit du chlorure de lithium (LiCl, Sigma, , 20mL/Kg, 0,2M) aux sujets du groupe Li, soit du chlorure de sodium (NaCl, 20mL/Kg, 0,9%) à ceux du groupe Na. Le LiCl (stimulus inconditionnel, SI) induit un malaise viscéral et rend les rats malades. Le NaCl sert de témoin afin de vérifier que l'injection, elle-même, ne déclenche pas de phénomène d'aversion.
- **Phase de récupération:** pendant les deux jours suivants, les rats disposent de dix minutes par jour dans les lickomètres pour consommer de l'eau. Cette phase permet d'éteindre la peur vis-à-vis du contexte expérimental que les animaux pourraient développer suite à la phase d'acquisition. En outre, elle permet aux animaux du groupe Li de récupérer du malaise viscéral qu'ils ont subi avant de tester l'AOPG.
- **Phase de test de l'AOPG:** nous examinons si les rats sont aversifs pour les SC utilisés lors de l'acquisition. Pour tester l'aversion au goût, nous plaçons de la saccharine (0.1%) dans le biberon mais pas d'odeur sur le papier filtre. Pour tester l'aversion à l'odeur, le biberon est rempli d'eau mais nous déposons 5 μ L de benzaldéhyde, diluée au 1/5 dans l'huile minérale, sur le papier filtre. Les animaux sont placés dans les lickomètres pendant dix minutes dans les deux cas. Ainsi, nous prenons en compte quatre groupes de sujets dont les noms et conditions expérimentales sont résumés dans le tableau 5.

Nom du groupe	Conditions expérimentales	
	Acquisition	Test
Li-O	Benzaldéhyde (O) + Saccharine (G) ↓30' LiCl	O
Li-G	Benzaldéhyde (O) + Saccharine (G) ↓30' LiCl	G
Na-O	Benzaldéhyde (O) + Saccharine (G) ↓30' NaCl	O
Na-G	Benzaldéhyde (O) + Saccharine (O) ↓30' NaCl	G

Tableau 5 : Noms des groupes et conditions expérimentales lors de l'AOPG (O : odeur, G : goût).

Nous considérons que les animaux sont aversifs uniquement si leur nombre de lapés en présence du goût ou de l'odeur diminue d'au moins 30% par rapport à celle relevée le jour de l'acquisition.

La force de l'aversion peut être estimée par le calcul du coefficient d'aversion (CA) par la formule suivante:

$$CA = (N_{acq} - N_{test}) / N_{acq}$$

avec N_{acq} le nombre de lapements fait le jour de l'acquisition et N_{test} le nombre de lapement effectué le jour du test.

La valeur du CA varie entre -1 et 1: plus elle est proche de 1 et plus l'animal exprime une aversion forte. Inversement, quand le CA est inférieur à zéro, c'est que le rat n'est pas aversif.

Quatre vingt dix minutes plus tard, les rats sont sacrifiés afin de procéder à la détection immunocytochimique des protéines Fos et Zif268. En plus des quatre groupes expérimentaux (Li-O, Na-O, Li-G et Na-G), nous sacrifions un cinquième groupe d'animaux : le groupe

contrôle de base (C). Ces animaux nous permettent de déterminer le taux d'expression basal de Fos et Zif268.

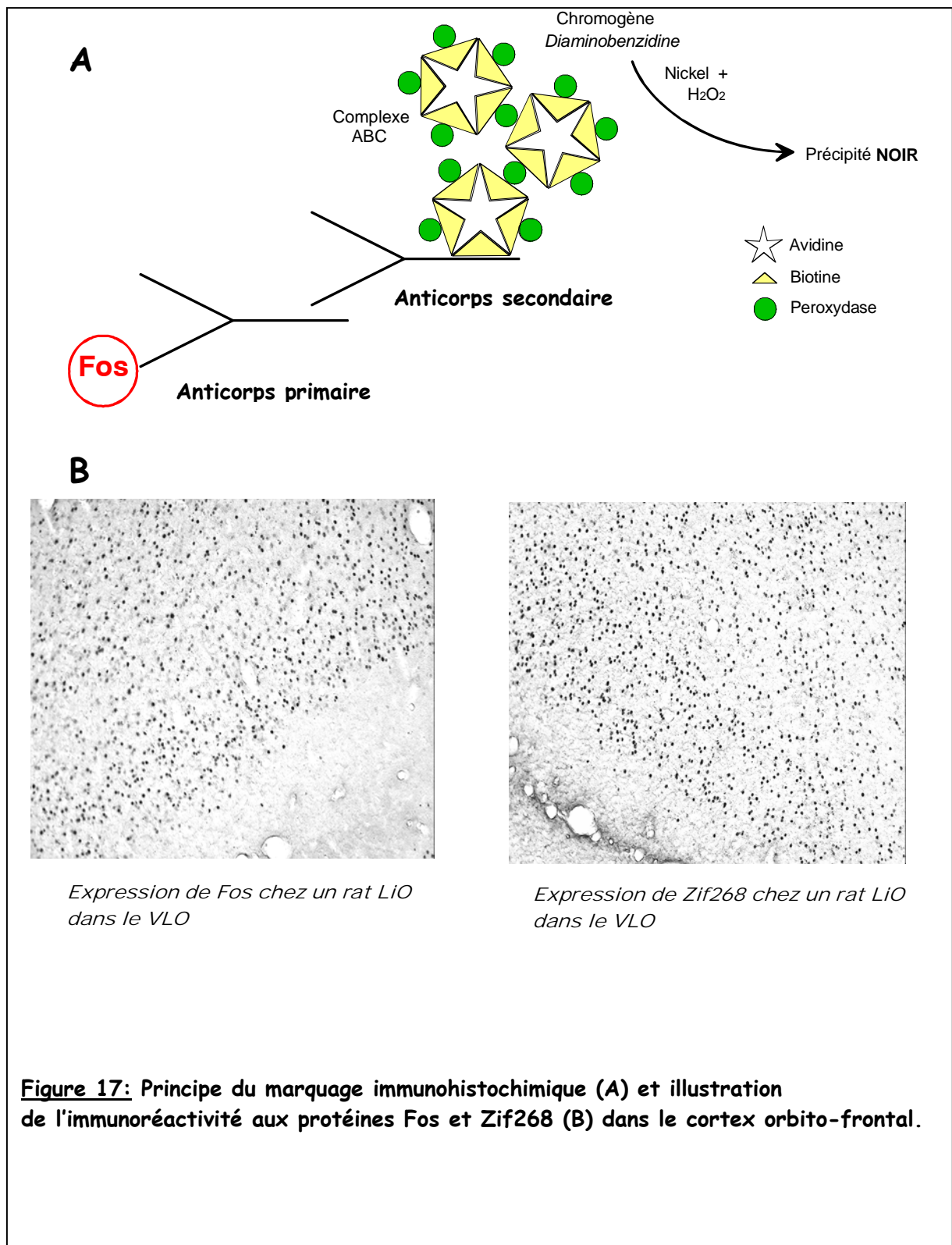
IV. Analyse du comportement et analyses statistiques.

Pour toutes les tâches comportementales présentées précédemment, nous avons enregistré, grâce à une caméra numérique Sony, tous les essais de l'ensemble des sessions et les données sont stockées sur des cassettes DV (Sony). Cet archivage permet de préciser l'analyse du comportement *a posteriori*.

Les différentes données collectées au cours de ces approches comportementales sont comparées à l'aide de divers tests statistiques :

- Chi Deux pour comparer la répartition des populations d'animaux.
- corrélations de rangs, ou de Spearman, pour analyser s'il existe un lien dynamique entre vieillissement et performances de rats.
- tests t apparié de Student, pour comparer l'évolution d'un paramètre au sein d'un seul groupe d'âge.
- analyses de variances (ANOVA): à un facteur suivi d'un test LSD (Least Significant Difference) ou à deux facteurs suivis d'un test de Kramer-Tukey. Pour toutes ces analyses, nous avons choisi de prendre $p < 0,05$ comme taux de significativité. Les facteurs analysés sont indiqués chaque fois qu'une de ces analyses est effectuée.

Pour toutes ces analyses statistiques, sauf pour le test du Chi Deux, nous avons utilisé le logiciel SAS.



V. Détection immocytochimique des protéines

Fos et Zif268.

Pour déterminer les réseaux neuronaux, nous avons choisi d'analyser, de façon quantitative l'expression cérébrale des protéines Fos et Zif 268 après le rappel de l'AOPG; nous avons donc suivi un protocole de fixation et de marquage immunohistochimique classique.

V.1. Fixation et prélèvement du cerveau.

Avant de sacrifier l'animal, nous l'anesthésions profondément avec de l'équithésine (4 mL/kg, i.p.) (pour 500mL de solution : 21,25g d'hydrate de chloral, 81ml de Nembutal, 198ml de propylène glycol et 10,63g de sulfate de magnésium et eau distillée qsp 1 litre). Grâce à une pompe à débit réglable, et après ouverture de la cage thoracique, nous le perfusions par voie intracardiaque avec :

- environ 150 mL de Ringer lactate (Lavoisier) à 4° contenant 1% d'héparine (Héparine Choay, Sanofi-Synthélabo) pour éviter la formation de caillots sanguins qui pourraient gêner la fixation.
- puis avec 500 mL d'un mélange fixateur composé contenant 4% de paraformaldéhyde (Fluka, France) et 0.2% d'acide picrique (Aldrich) dilués dans un tampon phosphate à 0,2M, pH 7,4 (ou PBST).

La perfusion terminée, nous ouvrons la boîte crânienne et prélevons le cerveau. Nous le plaçons ensuite dans 100 mL d'une solution de post-fixation (contenant 2% de paraformaldéhyde et 0.2% d'acide picrique dans du PBST) pendant 24h à 4° puis dans 100 mL d'une solution de cryoprotection (PBST additionné de 30% de saccharose). Ensuite, nous effectuons des coupes coronales, de 30µm d'épaisseur, des cerveaux à l'aide d'un cryostat. Celles-ci sont ensuite rincées dans un tampon phosphate et conservées à 4° dans du PBST contenant de l'azide (0.1%, Sigma).

V.2. Immunohistochimie des protéines Fos et Zif268.

Le principe du marquage immunohistochimique est illustré par la figure 17 et ses étapes sont résumées dans le paragraphe suivant.

Nous rinçons d'abord les coupes deux fois dans du PBST 0.1M pH 7.4. Ensuite, par passage de 30 minutes dans une solution de PBST 0.1M pH 7.4 contenant 0.3% de H₂O₂, nous bloquons l'activité des peroxydases endogènes qui pourraient altérer la qualité du marquage. Nous rinçons alors les coupes dans du PBST 0.1M à pH 7.4 deux fois de suite pendant cinq minutes. Les sites non spécifiques sont saturés par une incubation des coupes dans une solution de PBST 0.1M pH 7.4 contenant 3% de sérum normal de chèvre (Normal Goat Serum, Vector Laboratories) pendant une heure, sous agitation et à température ambiante.

Nous incubons ensuite les coupes dans une solution de PBST 0.1M pH 7.4 contenant l'anticorps primaire, selon les dilutions suivantes :

- pour le marquage de Fos : anticorps anti-fos (anti-c-fos (Ab5) rabbit, Oncogene), dilution 1/5000.
- pour le marquage de Zif268 : anticorps anti-Egr1 (anti-Egr1 (c19) sc189 rabbit, Santa Cruz Biotech), dilution 1/1000.

L'incubation dure deux jours à 4°C sous agitation constante.

Après cette incubation, nous plaçons les coupes dans une solution de PBST 0.1M pH 7.4 contenant l'anticorps secondaire couplé à la biotine (biotinylated anti-rabbit IgG (H+L), Vector Laboratories) pendant 24h à 4° puis pendant une heure à température ambiante sous agitation continue. Ensuite, les coupes sont placées dans une solution de PBST 0.1M pH 7.4 contenant une solution du complexe avidine-biotine (Vectastain Elite ABC kit, Sigma) pendant 1h30. Entre chaque incubation, les coupes sont rincées cinq fois dans du PBST.

Finalement nous révélons le marquage en plaçant les coupes dans une solution tampon de TrisHCl (pH 7,6) contenant 20 mg de diaminobenzédine, 0,6 g de nickel d'ammonium et 20 µL d'H₂O₂. Les cellules exprimant les protéines Fos ou Zif268 sont caractérisées par la présence d'un précipité noir-violet. Les coupes sont ensuite montées sur lames et déshydratées.

V.3. Analyse des coupes cérébrales.

Pour déterminer le nombre de cellules immunoréactives nous analysons les coupes avec le logiciel Optilab. La localisation des structures est déterminée grâce à l'atlas Paxinos et Watson (1986). Pour cette étude, nous avons considéré les structures suivantes dont les coordonnées sont indiquées par rapport à la ligne interaurale:

- le cortex piriforme: pour sa partie antérieure (CPa) nous avons compté les cellules marquées aux niveaux +12,7 mm, +11,7 mm, +10,7 mm et +9,7 mm et, pour sa partie postérieure (CPr), aux niveaux +8,7 mm, +7,7mm, +6,7 mm et 5,7mm.
- Le cortex entorhinal (EC) aux niveaux +3,7 mm et +3,2 mm.
- Les noyaux basolatéral (BLA), central (Ce) et médian (Med) de l'amygdale au niveau +5,7 mm.
- Le cortex orbito-frontal (VLO) au niveau +12,7mm.
- Le cortex préfrontal médian (mPFC) au niveau +12,2 mm.
- L'hippocampe dorsal (Hipp) au niveau +5,7 mm.
- Le cortex insulaire: la région dysgranulaire (CI) au niveau +9,7 mm.

Pour les structures cérébrales bien délimitées et facilement repérables, le CP, BLA, Ce, Med, et l'Hipp nous avons compté les cellules Fos et Zif268 dans toute leur étendue pour le niveau choisi.

En ce qui concerne les structures plus difficiles à délimiter comme le VLO, le mPFC, le CI, et l'EC, nous avons quantifié le nombre de cellules marquées dans une fenêtre, dont la surface et la localisation sont déterminées et constantes; dans ces cas, nous exprimons les résultats en nombre de cellules immunoréactives par mm².

Pour comparer les modifications des marquages Fos et Zif268 au sein des différents groupes expérimentaux, nous avons utilisés les analyses statistiques suivantes:

- pour mesurer l'effet des conditions expérimentales et déterminer ainsi si les groupes Li (Li-O et Li-G) et Na (Na-O et Na-G) sont significativement différents du groupe contrôle de base, nous avons calculé une ANOVA à un facteur (facteur conditions expérimentales) suivie d'un test de Dunett (significativité : $p < 0,05$). Ce test permet de comparer les groupes expérimentaux au groupe contrôle.
- Nous effectuons également une ANOVA à 2 voies, un facteur étant le groupe expérimental (Li versus Na) et l'autre facteur étant la nature du stimulus conditionnel (odeur versus goût). L'ANOVA est suivie d'un test de Tukey Kramer avec comme taux de significativité $p < 0,05$.

∞DONNEES ORIGINALES∞

CHAPITRE 1

**Mise au point méthodologique: étude
de divers paramètres expérimentaux.**

Le but de cette thèse est de définir le (s) réseau(x) qui pourrai(en)t sous tendre le rappel de l'AOPG et de le(s) comparer au cours du vieillissement du rat. Néanmoins, lors d'une étude longitudinale, plusieurs paramètres doivent être considérés afin d'optimiser l'apprentissage et le rappel de l'AOPG. Nous avons donc testé plusieurs facteurs qui pouvaient les influencer : la qualité du stimulus olfactif; la souche de Rat et le délai entre la présentation simultanée des stimuli conditionnels (olfactif et gustatif) et l'injection de LiCl.

Une partie des données présentées dans cette partie ont été publiées dans l'article (Annexe2):

Dardou D., Datiche F. and Cattarelli M. (2006). « Fos and Egr1 expression in the rat brain in response to olfactory cue after taste-potentiated odor aversion retrieval. » Learn. Mem. 13(12): 150-160.

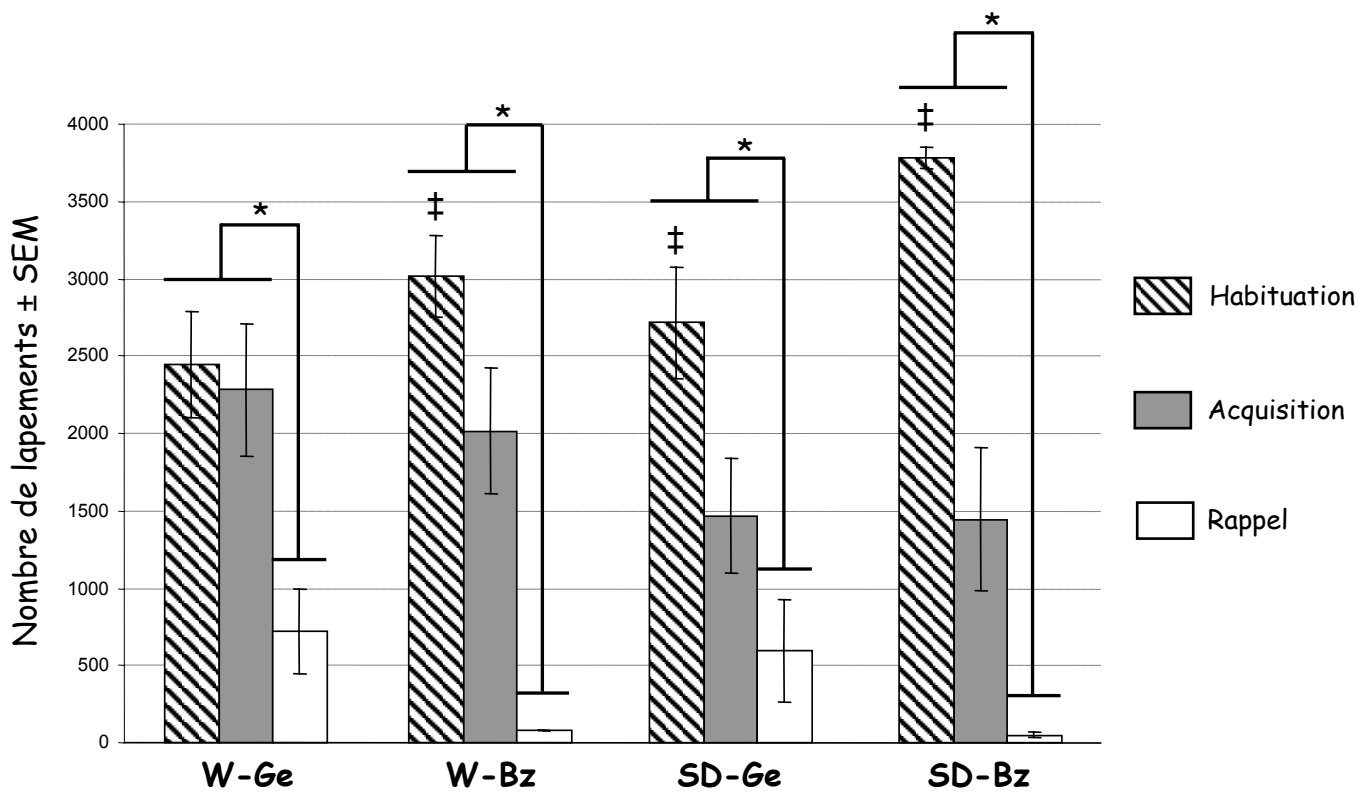


Figure 18: Consommation hydrique des groupes W-Ge, W-Bz, SD-Ge et SD-Bz.

Légendes:

‡: La consommation le jour de l'acquisition est significativement différente ($p < 0,05$) de celle de référence.

*: Différence significative ($p < 0,05$).

Ge: géraniole Bz: benzaldéhyde

W: rats wistar SD: rats sprague dawley

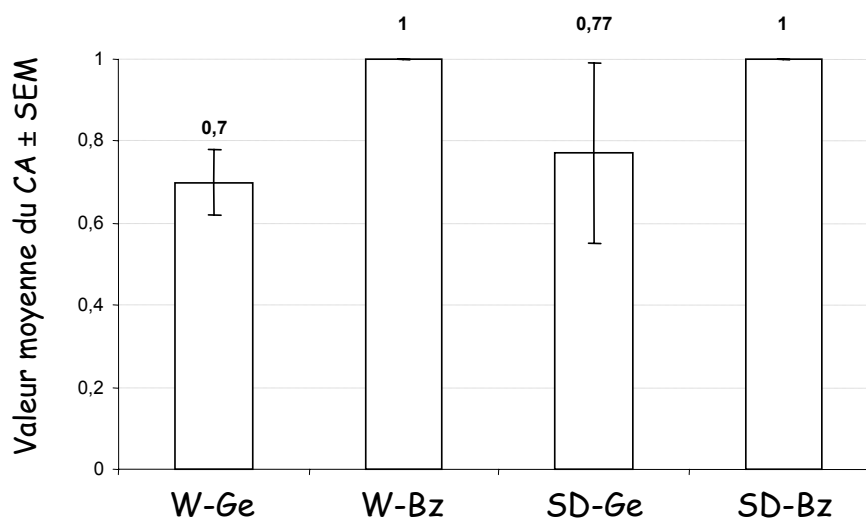


Figure 19: Coefficients d'aversion (CA) des groupes W-Ge, W-Bz, SD-Ge et SD-Bz

1) Effets de la souche de rats et de la qualité des stimuli odorants

Nous avons testé deux souches de rats, Wistar (W) et Sprague Dawley (SD), que nous avons soumis au protocole de l'AOPG en utilisant soit le géraniol (Ge), soit le benzaldéhyde (Bz), comme stimulation olfactive. L'acquisition et le rappel de l'AOPG ont donc été examinés chez les quatre groupes expérimentaux suivants : W-Ge, W-Bz, SD-Ge, SD-Bz.

Selon le critère d'aversion choisi, diminution d'au moins 30% du nombre de lapements, nous remarquons qu'en présence du Ge, 62% des rats W et 40% des SD sont aversifs (tableau 6) alors qu'en présence du Bz, 80% des animaux SD mais aussi W le sont.

Groupes	Effectif Total	Nombre de rats aversifs	% de rats aversifs
W-Ge	21	13	62
W-Bz	5	4	80
SD-Ge	5	2	40
SD-Bz	5	4	80

Tableau 6: Effectifs et pourcentages de rats aversifs selon les conditions expérimentales.

Nous avons analysé l'évolution du nombre de lapements chez les animaux aversifs (Figure 18) par une ANOVA à un facteur (la session, c'est-à-dire: habituation, acquisition et test) suivie d'un test de t. Cette analyse indique un effet de la session sur le nombre de lapements pour les quatre groupes de rats : W-Ge ($F[2,36]= 7,25$; $p<0,05$), W-Bz ($F[2,9]= 30,16$; $p<0,05$), SD-Ge ($F[2,3]= 30,2$; $p<0,05$) et SD-Bz ($F[2,9]= 12,08$; $p<0,05$). Chez les W-Bz, les SD-Ge et les SD-Bz, nous notons une réduction significative ($p<0,05$) du nombre de lapements le jour de l'acquisition par rapport à la période d'habituation (Figure 18), ce qui semble refléter une certaine néophobie vis-à-vis des stimuli présentés. D'autre part, chez tous les groupes, la consommation est significativement ($p<0,05$) plus faible le jour du test de rappel que lors de l'acquisition.

De plus, le calcul du coefficient d'aversion chez les rats aversifs, montre que la force de l'aversion tend à être supérieure chez les animaux conditionnés avec le Bz (Figure 19). Toutefois, la différence avec le Ge n'est pas significative que ce soit chez les rats W ou SD (ANOVA à une voie, avec le stimulus conditionnel (géraniol versus benzaldéhyde) comme facteur, suivie d'un test de t,) pour les rats W ($F[1,15]= 0,42$; $p>0,05$) et SD ($F[1,4]= 0,32$; $p>0,05$).

En conclusion, le pourcentage de rats aversifs est plus élevé lorsque l'AOPG est acquise en présence du benzaldéhyde que ce soit pour chez les Sprague Dawley ou les Wistar. De plus, cette odeur engendre de plus forts coefficients d'aversion.

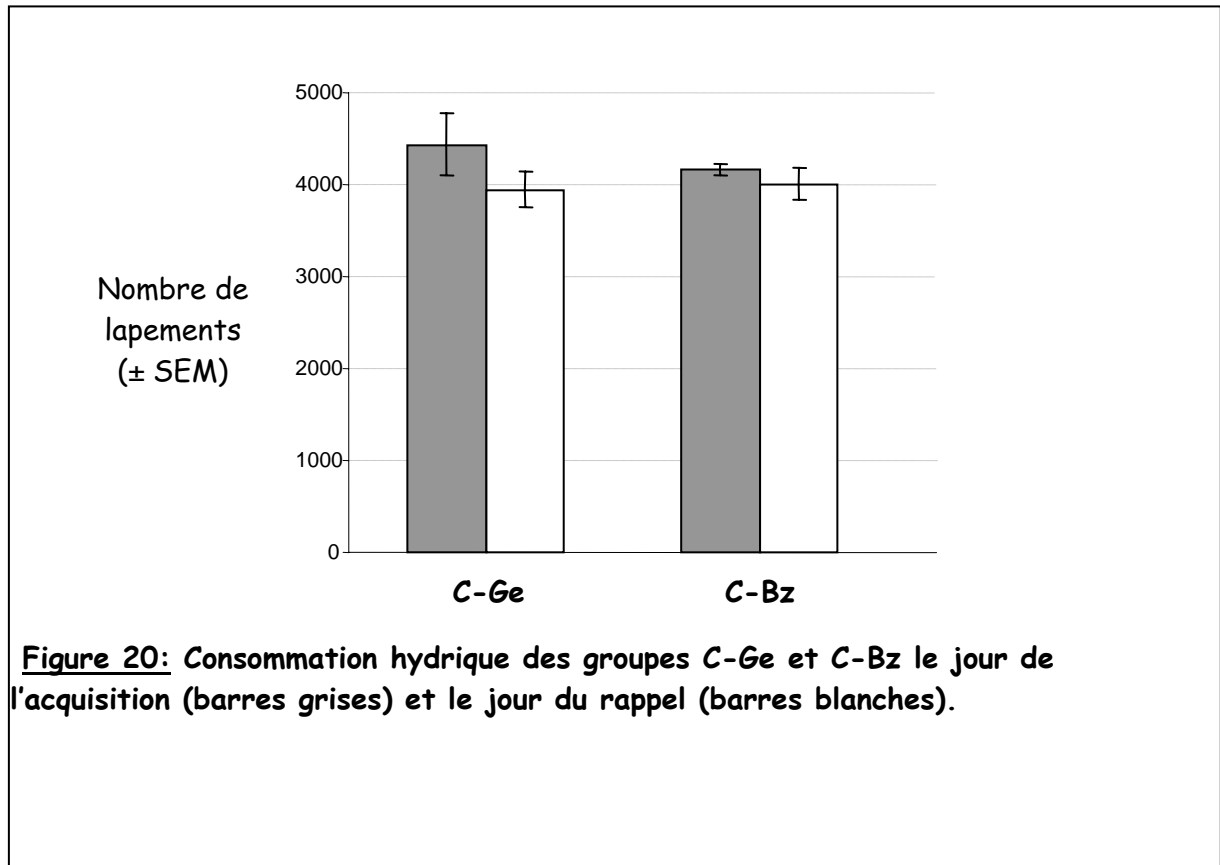


Figure 20: Consommation hydrique des groupes C-Ge et C-Bz le jour de l'acquisition (barres grises) et le jour du rappel (barres blanches).

2) Influence du délai entre la présentation des stimuli conditionnels (odeur et goût) et inconditionnel (LiCl): AOC ou AOPG ?

Dans de nombreuses études, un délai de 30 min entre la présentation des stimuli conditionnels et l'injection de LiCl est utilisé afin d'induire une AOPG. Nous avons donc vérifié qu'avec un tel délai, une AOC seule ne peut s'établir mais que l'animal ne devient bien aversif vis-à-vis de l'odeur que lorsque celle est présentée simultanément au goût lors de l'acquisition, et ceci lorsque le Ge ou le Bz sont utilisés comme stimulus conditionnel. Pour cela, nous avons considéré les groupes expérimentaux "contrôles" (C) suivants :

- Le groupe C-Ge: des rats W (n=4), stimulés uniquement par Ge, reçoivent 30 min plus tard une injection de LiCl.
- Le groupe C-Bz: des rats SD (n=4), stimulés par le Bz seul, reçoivent 30 min plus tard une injection de LiCl.

Deux jours plus tard, nous testons les rats C-Ge et C-Bz en présence du Ge seul ou du Bz seul respectivement (Figure 20). Chez ces deux groupes de rats, les analyses statistiques (ANOVA à une voie (avec le stimulus conditionnel (géraniol versus benzaldéhyde) comme facteur) suivie d'un test de t) ne montrent pas de modification significative du nombre de lapements entre les sessions d'acquisition et de test (C-Ge: $F[1,6] = 1.27$; $p > 0.05$ et C-Bz: ($F[1,6] = 0,96$; $p > 0.05$). Ainsi, un délai de 30 min ne permet ni au géraniol, ni au benzaldéhyde, délivrés seuls et suivis du malaise gastrique lors de l'acquisition, d'entraîner ultérieurement une AOC.

En conclusion, les résultats indiquent que l'AOPG est inductible avec des composés olfactifs différents mais que le benzaldéhyde induit une aversion plus forte et, cela, chez un nombre plus important de rats. Vis-à-vis de cette odeur, les rats Sprague Dawley apparaissent aussi réactifs que les rats Wistar. Etant donné qu'il est plus facile de se procurer, dans les animaleries, des Sprague Dawley âgés que des Wistar âgés, nous avons donc décidé d'utiliser les rats SD pour la suite de notre étude. D'autre part, le délai de 30 min s'avère adéquat pour l'établissement de l'AOPG, sans interférence avec le phénomène d'AOC.

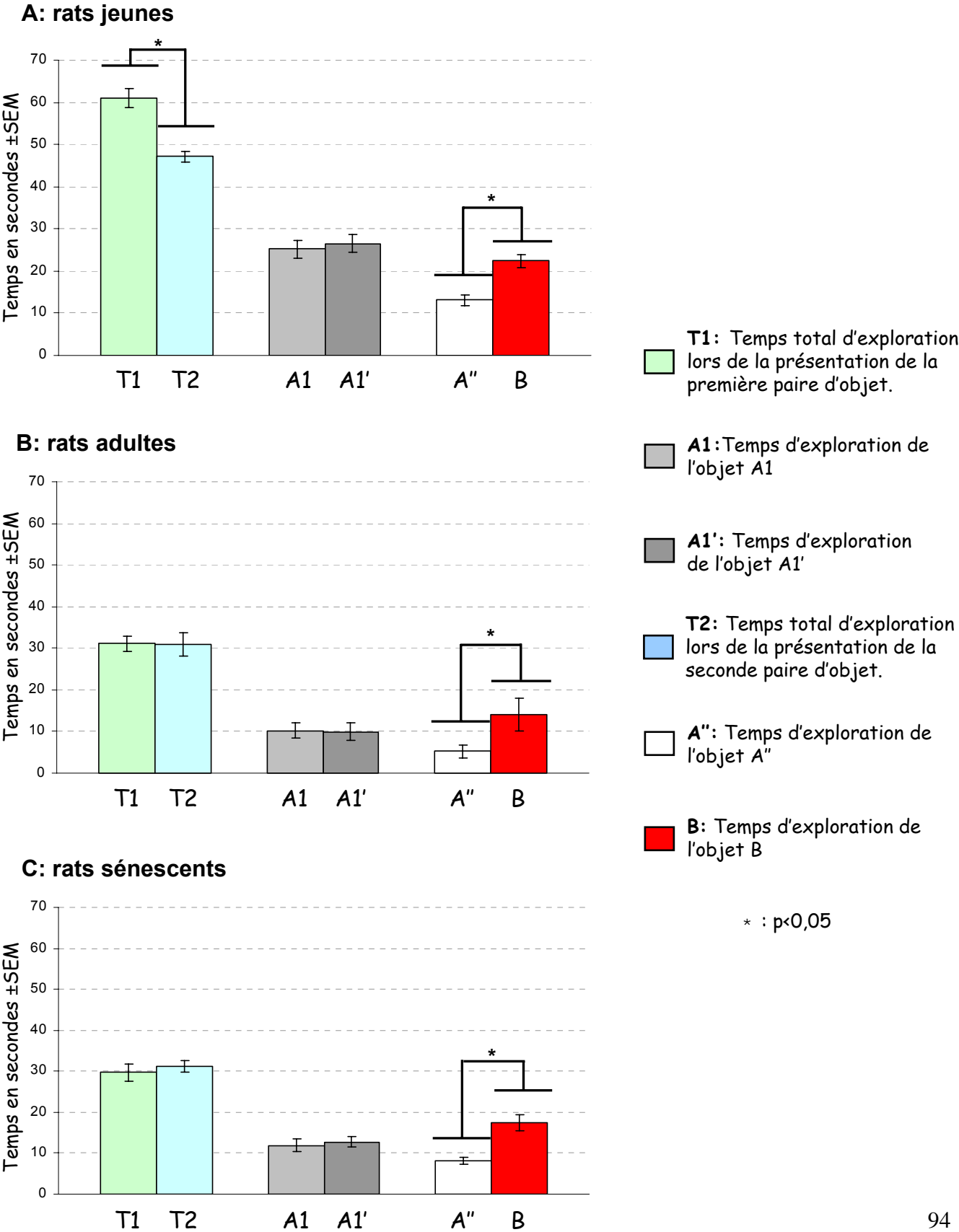
CHAPITRE 2

**Effet de l'âge sur le rappel de
l'AOPG : étude comportementale
et neuro-anatomo-fonctionnelle.**

I. Etude comportementale

TÂCHE DE RECONNAISSANCE D'OBJET

Figure 21: Temps d'exploration



I.1. Analyse des capacités attentionnelles chez des rats jeunes, adultes et sénescents: tâche de reconnaissance d'objets.

Dans cette tâche, les rats sont initialement exposés à deux objets identiques (A1 et A1'). Deux minutes plus tard, ils sont mis en présence d'un objet similaire (A'') aux précédents et d'un nouvel objet (B). Dans chaque cas, nous avons mesuré le temps total d'exploration (enceinte expérimentale et objets) ainsi que le temps d'exploration de chacun des objets par les rats jeunes, adultes et sénescents (tableau 7).

Age	Effectif
Jeunes	17
Adultes	9
Sénescents	8

Tableau 7: Effectifs des trois groupes d'âges pour la tâche de reconnaissance d'objet

N.B. : Nous avons choisi de regrouper toutes les comparaisons statistiques dans l'annexe 3. Nous n'avons indiqué directement dans le texte ci-dessous, et afin d'en faciliter la lecture, que les seuls résultats significatifs.

Pour chaque âge considéré, nous avons analysé les résultats obtenus lors de la première et de la seconde présentation d'objets à l'aide d'un test t apparié de Student. Les rats jeunes montrent une diminution significative ($p < 0,05$) de leur temps total d'exploration entre la première et la seconde présentation ($t(16) = 4.45$, $p < 0.05$), contrairement aux adultes et aux sénescents (Figure 21). Quel que soit l'âge des rats, nous ne notons pas de différence significative du temps d'exploration des objets similaires A1 et A1'. En revanche, lors de la seconde présentation, le nouvel objet (B) est significativement ($p < 0,05$) plus exploré que

l'objet connu (A"), aussi bien par les jeunes rats ($t(16)=6.41, p<0.0001$), que par les adultes ($t(8)=3.01, p<0.05$) et les sénescents ($t(7)=2.96, p<0.05$).

Nous avons étudié les modifications des temps d'exploration en fonction de l'âge et de la session par une ANOVA à deux facteurs (le premier étant l'âge, le second la session d'exploration¹), suivie d'une comparaison de moyennes (test de Kramer-Tukey). Cette analyse indique un effet de l'âge ($F[2,186]= 95,4, p<0.0001$), un effet de la session d'exploration ($F[5,186]= 30,74, p<0.0001$), ainsi qu'une interaction entre ces deux facteurs ($F[10,186]= 3,98, p<0,0001$).

Chez les animaux jeunes, nous observons que les temps d'exploration T1 et T2 ainsi que les temps d'exploration des objets A1, A1' et A" sont significativement ($p<0,05$) plus élevés que ceux des adultes et des sénescents. Par contre, nous ne constatons pas de changement significatif du temps d'exploration du nouvel objet (B) en fonction de l'âge de l'animal. Enfin, nous pouvons souligner que les temps d'exploration des rats adultes ne diffèrent pas significativement de ceux des sénescents.

En résumé, nos résultats montrent que les rats jeunes ont des temps d'exploration plus élevés que les rats adultes et sénescents. Cette observation suggère une différence du niveau attentionnel accordé aux objets et au contexte expérimental selon l'âge de l'animal. Toutefois, nos données indiquent que, dans nos conditions expérimentales, la rétention à court-terme des informations n'est pas significativement modifiée en fonction de l'âge. En effet, après un délai de deux minutes la reconnaissance n'est pas altérée puisque tous les rats, même les plus âgés, explorent préférentiellement le nouvel objet.

¹ Les sessions considérées sont : T1, T2, A1, A1', A" et B.

I.2. Performances des trois groupes de rats, jeunes, adultes et sénescents, soumis à l'apprentissage et au rappel d'une tâche de discrimination olfactive.

Lors de la tâche de discrimination olfactive, les rats des trois groupes d'âge doivent apprendre à discriminer trois odeurs et à associer l'une d'entre elles (l'acéto-acétate d'éthyle) avec l'obtention d'une récompense alimentaire. Les animaux disposent au maximum de quatre sessions (une par jour) de cinq essais chacune pour acquérir la tâche.

Bien que les animaux soient préalablement habitués au contexte de cette expérience (l'enceinte expérimentale), nous constatons que 1 rat jeune, 1 adulte et 5 sénescents restent immobiles une fois placés dans le dispositif. Ces animaux immobiles, plus nombreux chez les sénescents que dans les deux autres groupes, ont été exclus de ce conditionnement olfactif et les résultats présentés ne concernent que les rats jeunes, adultes et âgés (tableau 8-A) explorant activement les éponges odorisées placées dans trois des coins de l'enceinte.

Nous observons que 79% des rats jeunes et 88% des adultes soumis au conditionnement parviennent à associer l'odeur d'acéto-acétate d'éthyle à la récompense et satisfont au critère d'apprentissage choisi (80% de choix corrects). Toutefois, 44% seulement des rats sénescents apprennent cette tâche (tableau 8-B). La comparaison de ces pourcentages par un test du Chi-deux montre que ces valeurs sont significativement différentes entre les jeunes et les sénescents d'une part ($\chi^2=6,24$ pour $p=0,05$) et les adultes et les sénescents d'autre part ($\chi^2=8,99$ pour $p=0,05$). Lors du test de rétention, nous notons que 71% des rats jeunes et 75% des rats adultes se souviennent correctement de l'association (nosepoke dans l'éponge odorisée à l'acéto-acétate d'éthyle). Par contre, seulement 33% des animaux réussissent à se la rappeler. La comparaison de ces pourcentages par un test du Chi-deux montre que ces valeurs sont significativement différentes entre les jeunes et les sénescents d'une part ($\chi^2=9,27$ pour $p=0,05$) et les adultes et les sénescents d'autre part ($\chi^2=10,8$ pour $p=0,05$).

Nous avons également examiné le nombre d'essais nécessaires pour atteindre le critère de réussite de 80% de choix corrects (figure 22). Une ANOVA à un facteur (l'âge) suivie d'un test de comparaison de moyenne (LSD) est effectuée. Nous mettons ainsi en évidence un effet significatif de l'âge ($F[2,45]= 23,94$; $p<0,05$).

DISCRIMINATION OLFACTIVE

Tableau 8: A- Effectifs des animaux mobiles, ayant appris l'association et s'en souvenant correctement. B- Pourcentages calculés d'après les effectifs de rats mobiles.

A		Mobiles	Apprentissage correct	Rappel correct	B		Apprentissage correct	Rappel correct
ÂGE	Jeunes	42	33	30	Jeunes	79	71	
	Adultes	8	7	6	Adultes	88	75	
	Sénescents	18	8	6	Sénescents	44	33	

Figure 22: Nombre d'essais (\pm SEM) nécessaires pour apprendre l'association.

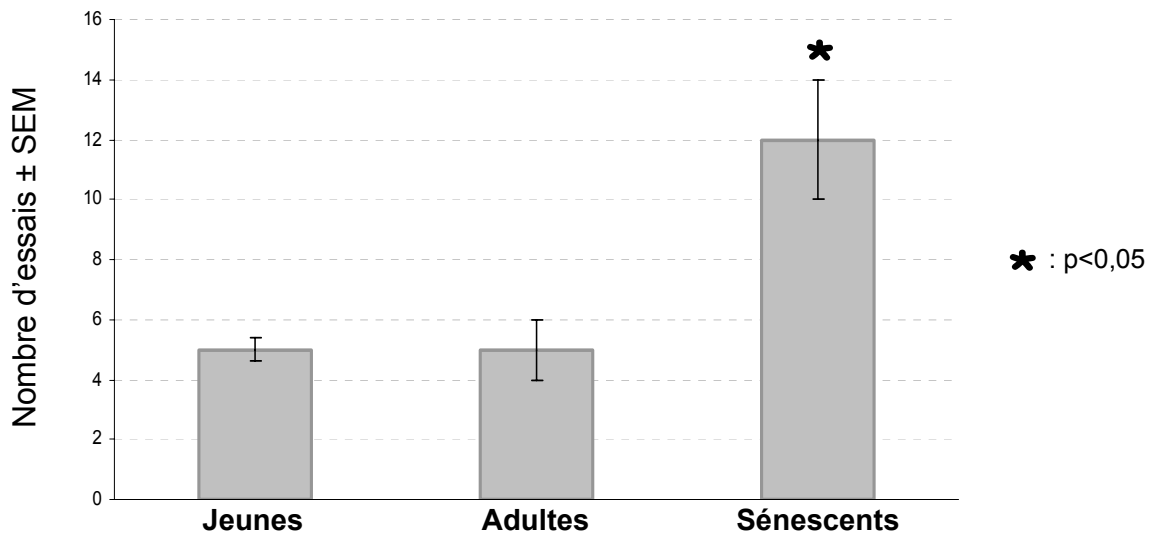
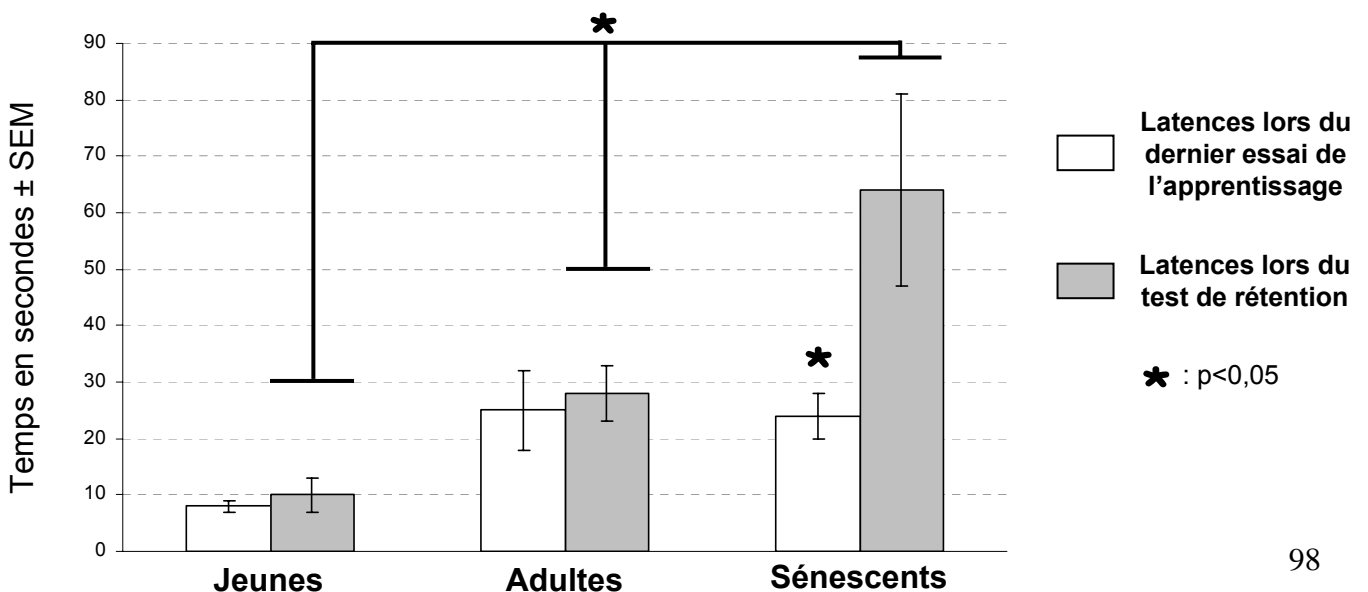


Figure 23: Latences (\pm SEM) pour trouver la récompense lors du dernier essai de l'apprentissage et pour effectuer le nosepoke le jour du test de rétention.



Le nombre d'essais requis pour apprendre la tâche de discrimination olfactive est significativement ($p < 0,05$) plus élevé chez les rats sénescents ($12 \text{ essais} \pm 1,3^2$) comparés aux jeunes et aux adultes (respectivement $5 \text{ essais} \pm 0,4$ et $5 \text{ essais} \pm 1$), nous ne notons pas de différence entre les jeunes et les adultes.

Comme l'illustre la figure 23, nous avons noté le temps mis par les animaux lors du dernier essai de l'apprentissage pour trouver la récompense de même que le temps nécessaire au nosepoke lors du test de rétention.

Nous avons effectué une ANOVA à deux facteurs, le premier étant l'âge, le second la session (apprentissage et rappel), suivie d'un test de comparaison des moyennes de Kramer-Tukey pour analyser les latences. Nous observons un effet de la session ($F[1,90] = 7,14$; $p < 0,05$), un effet de l'âge ($F[2,90] = 18,28$; $p < 0,0001$), ainsi qu'une interaction entre ces deux facteurs ($F[2,90] = 5,36$; $p < 0,05$). Lors du test de rétention, et contrairement aux rats jeunes et adultes, les sujets sénescents ont une latence moyenne significativement ($p < 0,05$) plus élevée que celle notée lors du dernier essai d'apprentissage.

Quel que soit l'âge de l'animal nous n'observons pas de différence significative de la latence lors du dernier essai de l'apprentissage. En revanche, la latence lors du rappel est significativement ($p < 0,05$) plus faible chez les rats jeunes et adultes par rapport aux rats sénescents, mais aucune différence n'est notée entre les jeunes et les adultes.

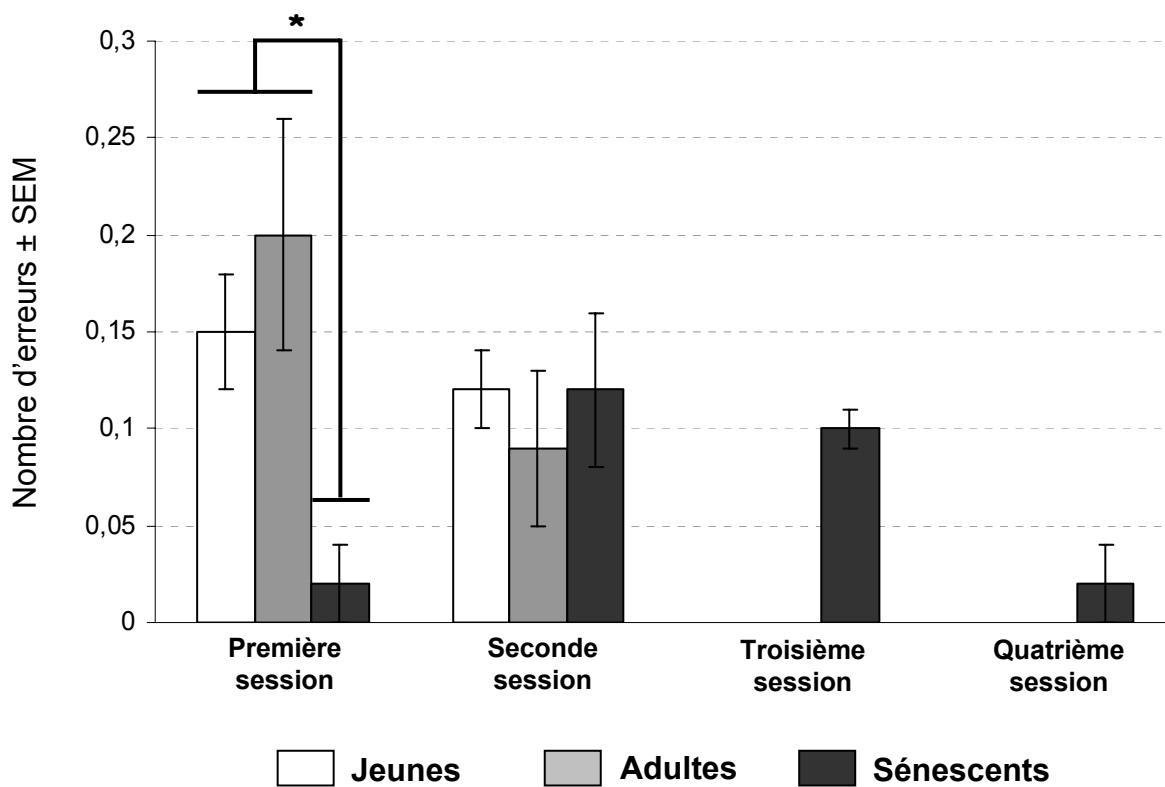
Enfin, les trois groupes de rats ne requérant pas le même nombre de sessions pour acquérir ce conditionnement, nous avons analysé séparément le nombre d'erreurs de référence (figure 24) (un rat effectue un nosepoke dans l'une des deux éponges non récompensées) en fonction des sessions et de l'âge des animaux.

Une ANOVA à un facteur, la session, n'indique pas d'effet sur le nombre d'erreurs de référence et cela, quel que soit l'âge des rats (jeunes: $F[1,64] = 0,23$; $p > 0,05$, adultes: $F[1,12] = 2,56$; $p > 0,05$ et sénescents: $F[3,28] = 1,38$; $p > 0,05$).

Une ANOVA à un facteur, l'âge, indique un effet de l'âge lors de la première session ($F[2,45] = 4,86$; $p < 0,05$) mais pas lors de la seconde ($F[2,45] = 0,47$; $p > 0,05$). La comparaison des moyennes par un test LSD montre que, chez les rats sénescents, le nombre

² \pm SEM, pour toutes les valeurs indiquées de façon similaire dans cette thèse.

Figure 24: Nombre moyen d'erreurs de référence lors des sessions d'apprentissage.



* : p<0,05

d'erreurs est significativement plus bas que celui recueilli chez les rats jeunes et adultes lors de la première session de conditionnement.

En résumé, nos résultats montrent que le nombre de sujets capables d'acquiescer la tâche de discrimination olfactive diminue chez les rats sénescents. De plus, ces animaux ont besoin d'un plus grand nombre d'essais pour atteindre le critère d'apprentissage (80% de choix corrects). Néanmoins, lorsque l'apprentissage est acquis, la plupart des animaux, quel que soit leur âge, s'en souviennent lorsqu'ils sont testés deux jours plus tard. Il semble donc que les effets de l'âge ne s'exercent pas de façon similaire selon le stade mnésique considéré, apprentissage ou rappel, puisque ce dernier n'apparaît pas significativement altéré. L'accroissement des latences avec l'âge refléterait soit des perturbations motrices liées au vieillissement, soit un échantillonnage un peu plus lent des signaux odorants chez les rats sénescents, soit un déficit mnésique réel. Les erreurs de référence moins nombreuses chez les rats sénescents lors de la première session de conditionnement pourraient refléter une exploration initialement plus modérée de l'enceinte expérimentale.

TÂCHE DE RETOUR AU GÎTE

Tableau 9: A- Effectifs des animaux mobiles, ayant appris à localiser la sortie et s'en souvenant correctement lors du premier apprentissage. B- Pourcentages calculés d'après les effectifs de rats mobiles.

A		Mobiles	Apprentissage correct	Rappel correct
ÂGE	Jeunes	16	12	11
	Adultes	5	3	3
	Sénescents	17	8	4

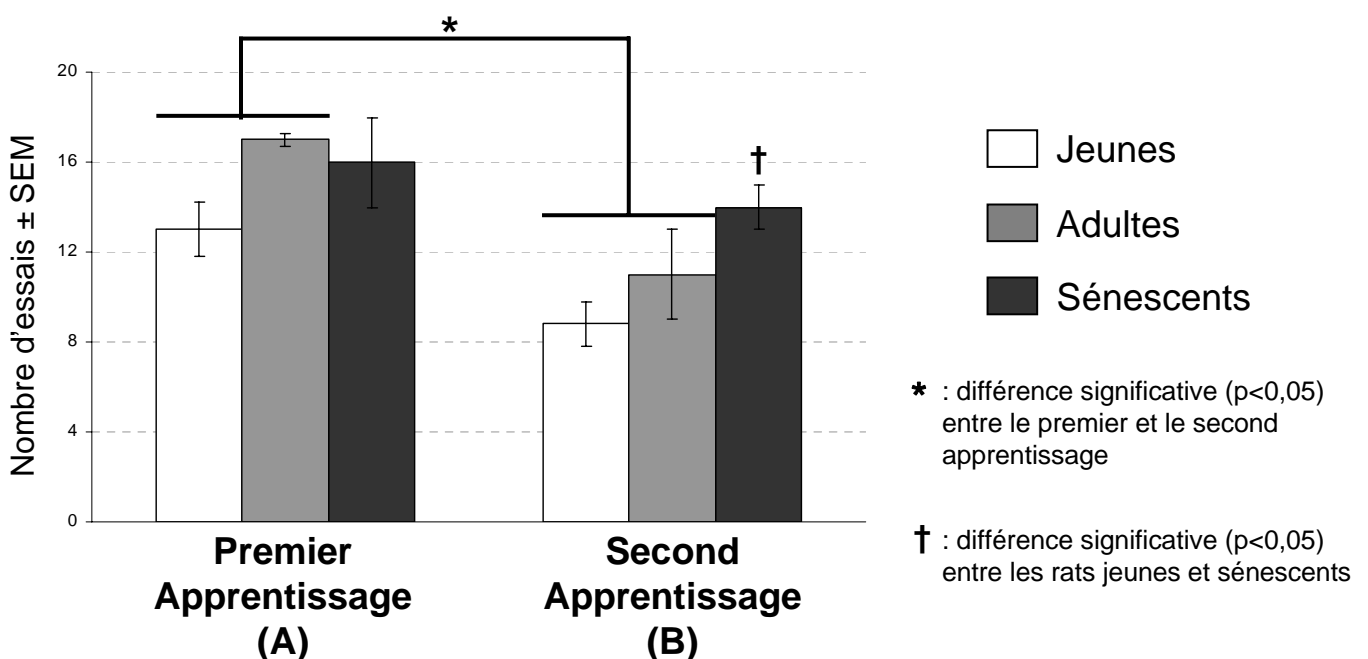
B		Apprentissage correct	Rappel correct
ÂGE	Jeunes	75	69
	Adultes	60	60
	Sénescents	47	24

Tableau 10: A- Effectifs des animaux mobiles, ayant appris à localiser la sortie et s'en souvenant correctement lors du second apprentissage. B- Pourcentages calculés d'après les effectifs de rats mobiles.

A		Mobiles	Apprentissage correct	Rappel correct
ÂGE	Jeunes	15	13	11
	Adultes	4	3	2
	Sénescents	16	8	3

B		Apprentissage correct	Rappel correct
ÂGE	Jeunes	87	73
	Adultes	75	50
	Sénescents	50	19

Figure 25: Nombre d'essais pour apprendre la localisation de la sortie.



I.3. Performances des trois groupes de rats, jeunes, adultes et sénescents, soumis à l'apprentissage et au rappel d'une tâche spatiale de retour au gîte.

Dans cet apprentissage spatial, les rats doivent apprendre la localisation d'une sortie en se basant sur des signaux visuels disposés dans le dispositif expérimental. Tous les animaux, quel que soient leurs performances sont soumis au premier et au second apprentissage de cette tâche. Dans un premier temps, les rats apprennent la localisation d'une sortie selon une configuration donnée des critères visuo-spatiaux. Dans un second temps, ils doivent apprendre la localisation d'une sortie différente de la précédente, mais avec une configuration similaire des critères de repérage spatial. Le critère d'apprentissage a été fixé à 60% de choix corrects et, dans chaque cas, le rappel est effectué deux jours après l'acquisition de la tâche.

I.3.a. Premier apprentissage spatial.

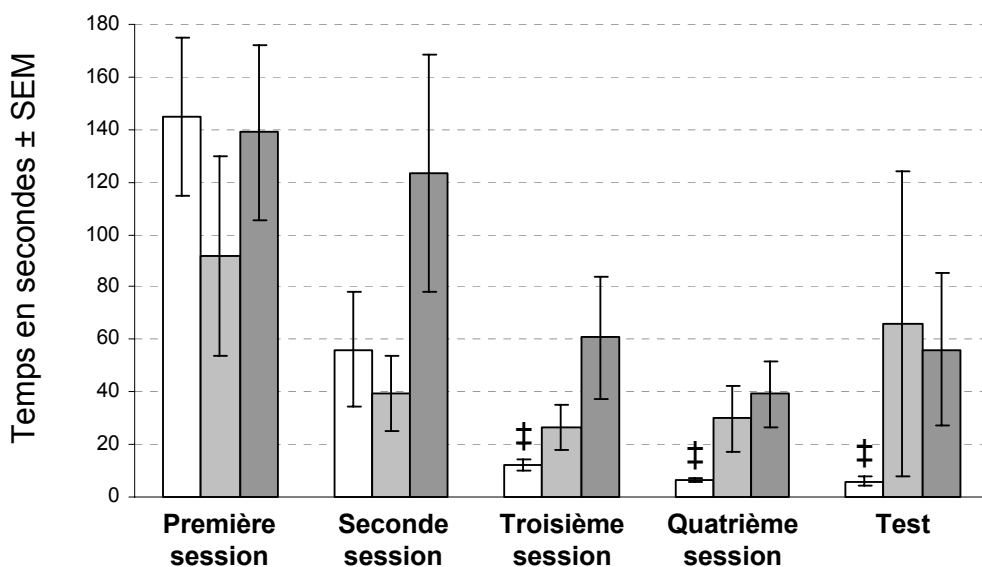
Malgré l'habituation préalable à l'enceinte expérimentale, et comme nous l'avions déjà observé pour la tâche précédente, 4 rats adultes et 5 sénescents restent immobiles une fois placés dans le dispositif et ne sont pas pris en compte dans la suite de cette tâche.

Les résultats présentés concernent donc les rats adultes (n=5) ou âgés (n=17) explorant activement l'enceinte et l'ensemble des jeunes, tous mobiles (n=16) (tableau 9-A).

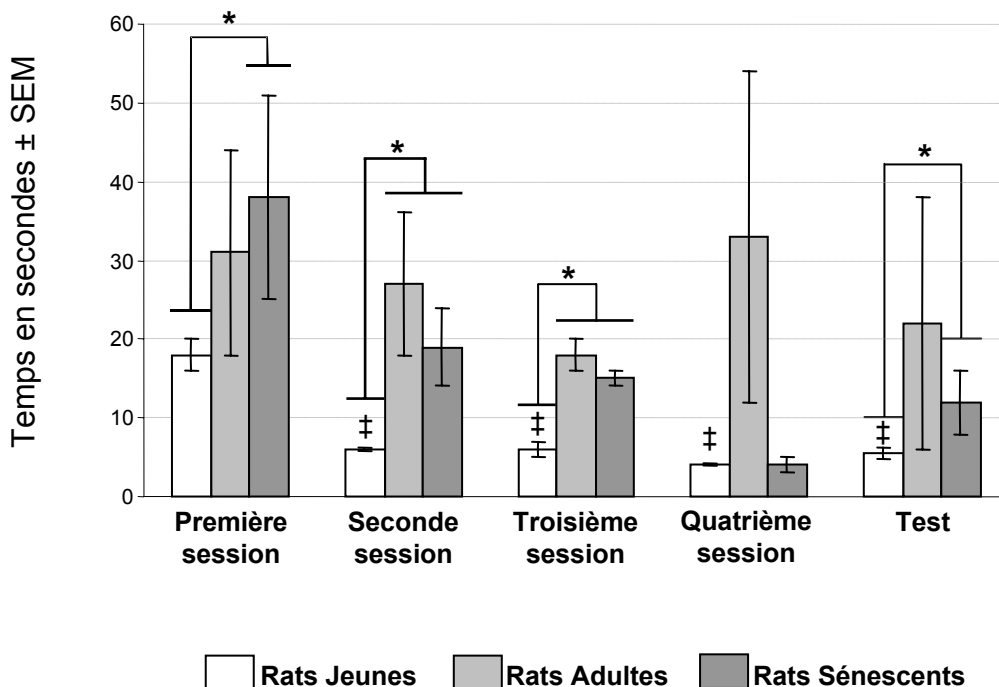
Nous observons que 75% des rats jeunes et 60% des adultes arrivent à apprendre la localisation de la sortie. En revanche, seulement 47% des rats sénescents réussissent cette tâche (tableau 9-B). La comparaison par un test de Chi-deux de ces pourcentages indique uniquement une différence significative entre les rats jeunes et sénescents ($\chi^2=4,03$; $p<0,05$). Lors du test de rétention, nous remarquons que 69% des rats jeunes et 60% des adultes mobiles se rappellent correctement la localisation de la sortie. Cependant, seulement 24% des rats sénescents s'en souviennent. Un test de Chi-deux indique une différence significative des pourcentages d'une part entre les rats jeunes et sénescents ($\chi^2=15,22$; $p<0,05$) et, d'autre part entre les rats adultes et sénescents ($\chi^2=11,04$; $p<0,05$).

Figure 26: Latences moyennes pour trouver la sortie lors du premier (A) et du second (B) apprentissage pour les trois groupes d'âge étudiés.

A- Premier apprentissage



B- Second apprentissage



* : $p < 0.05$ ‡ : différent de la première session.

La figure 25-A illustre les nombres d'essais nécessaires pour atteindre le critère de réussite, nombres que nous avons comparé par une ANOVA à un facteur (l'âge). Pour ce premier apprentissage spatial, nous ne mettons pas en évidence d'effet significatif de l'âge ($F[2,20]= 1,08 ; p>0,05$).

Nous avons analysé les temps moyens nécessaires pour trouver la sortie lors de chaque session d'apprentissage et lors du test de rappel (Figure 26-A).

Une ANOVA à deux facteurs (le premier étant l'âge, le second la session³) suivie d'un test de Kramer-Tukey pour comparer les moyennes a été effectuée. Nous observons un effet de la session ($F[4,100]= 8,21 ; p<0.0001$), mais pas d'effet de l'âge ($F[2,100]= 1,97 ; p>0.05$) ni d'interaction entre ces deux facteurs ($F[8,100]= 0,41 ; p>0,05$). Chez les rats jeunes uniquement, nous observons que les latences pour trouver la localisation de la sortie lors des troisième et quatrième sessions sont significativement plus faibles que celle notées lors de la première session. Chez ces mêmes animaux nous observons aussi que la latence lors du rappel est significativement ($p<0,05$) inférieure à celle de la première session (figure 26-A).

Enfin, nous avons analysé le nombre d'erreurs de référence au fil des sessions, c'est à dire lorsque le rat se trompe de sortie (figure 27-A) par une ANOVA à deux voies avec comme premier facteur la session d'apprentissage et comme second facteur l'âge, suivie d'une comparaison de moyennes par un test de Kramer-Tukey. Nous observons un effet de la session ($F[3,80]= 5,15 ; p<0,05$), aucun effet de l'âge ($F[2,80]= 0,99 ; p>0,05$), ni d'interaction entre ces facteurs ($F[6,80]= 1,55 ; p>0,05$). Chez les rats jeunes, le nombre d'erreurs lors de la seconde session est significativement plus important que celui recueilli lors de la quatrième session de conditionnement. Aucune autre différence significative n'est mise en évidence.

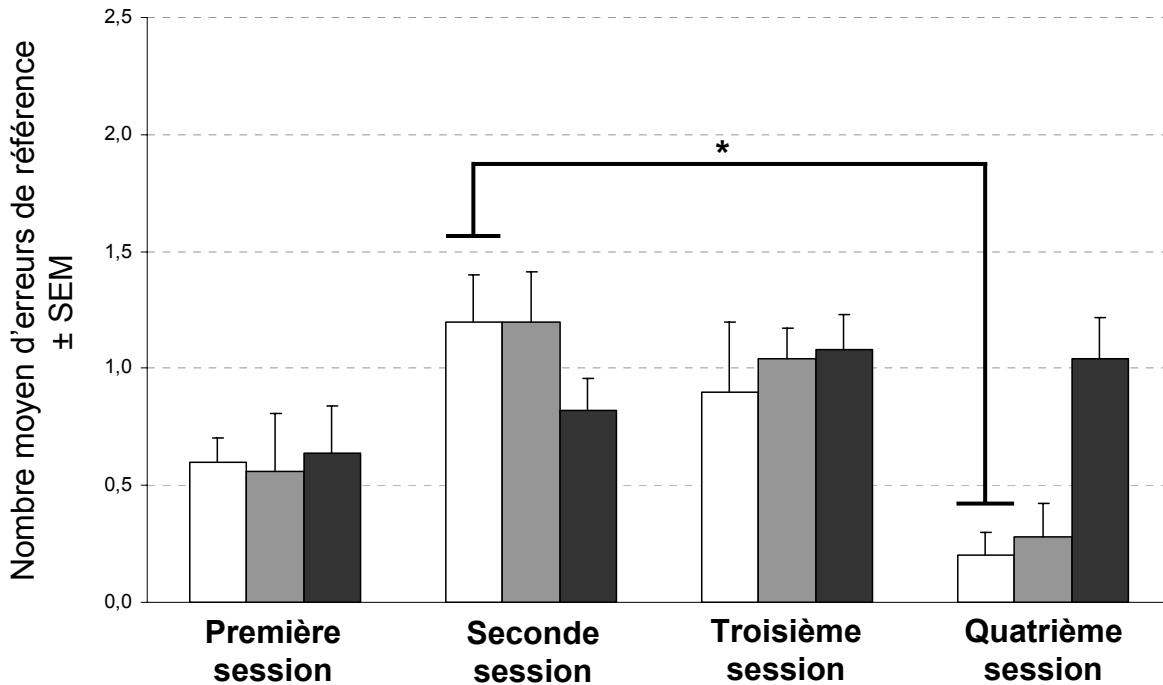
I.3.b. Second apprentissage spatial.

Lors du second apprentissage, nous notons encore que 5 rats adultes et 5 sénescents restent immobiles une fois placés dans le dispositif; ils ne sont donc pas pris en compte pour l'expression des résultats (tableau 10-A) qui portent donc sur 4 adultes, 16 sénescents et 15

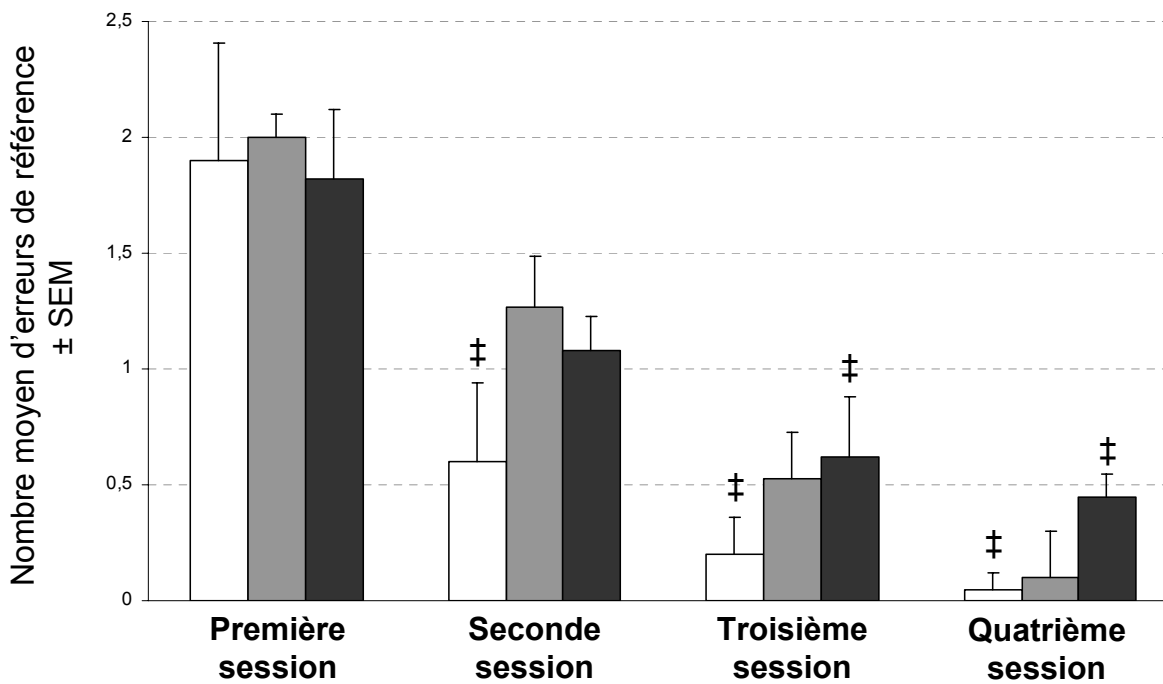
³ Les sessions: les quatre sessions de conditionnement et le test de rétention.

Figure 27: Nombre moyen d'erreurs de référence des rats mobiles pendant l'acquisition du premier (A) et du second (B) apprentissage.

A- Premier apprentissage



B- Second apprentissage



□ Jeunes ■ Adultes ■ Sénescents

*: $p < 0,05$

‡ : différents de la première session.

jeunes qui exploraient activement l'enceinte (un jeune n'a pas participé à ce second apprentissage car il boitait).

Nous observons que 87% des rats jeunes et 75% des adultes arrivent à apprendre la localisation de la sortie. Par contre, seulement 50% des rats sénescents apprennent cette tâche (tableau 10-B). La comparaison par un test de Chi-deux de ces pourcentages indique une différence significative entre les rats jeunes et sénescents ($\chi^2=6$; $p<0,05$). Lors du test de rétention, nous notons que 73% des rats jeunes et 50% des adultes mobiles se rappellent correctement la localisation de la sortie tandis que seulement 19% des rats sénescents s'en souviennent. Un test de Chi-deux indique que ces pourcentages sont significativement différents entre les rats jeunes et les sénescents ($\chi^2=22,48$; $p<0,05$) d'une part, et entre les adultes et les sénescents ($\chi^2=10,5$; $p<0,05$) d'autre part.

Le nombre d'essais nécessaires pour atteindre le critère de réussite (figure 25-B) est analysé par une ANOVA à un facteur (l'âge) suivie d'un test de comparaison de moyenne (LSD). Nous mettons ainsi en évidence un effet significatif de l'âge ($F[2,21]= 6,34$; $p<0,05$). Le nombre d'essais requis pour apprendre la localisation de la sortie est significativement ($p<0,05$) plus élevé chez les rats sénescents que chez les jeunes.

Afin d'analyser les temps moyens mis pour trouver la sortie lors de chaque session d'apprentissage et lors de la session de rappel, nous avons effectué une ANOVA à deux facteurs (le premier étant l'âge et le second la session⁴) suivie d'un test de comparaison de moyennes de Kramer-Tukey. Nous observons un effet de la session ($F[4,105]= 5,94$; $p<0,05$), un effet de l'âge ($F[2,105]= 9,13$; $p<0,05$), mais pas d'interaction entre ces deux facteurs ($F[8,105]= 1,5$; $p>0,05$). Lors de la première session, la latence est significativement plus faible chez les rats jeunes que chez les sénescents (figure 26-B). Lors de la seconde et de la troisième session la latence est significativement plus faible chez les rats jeunes par rapport aux sénescents et aux adultes. Lors de la quatrième session aucune différence significative de la latence n'est observée quel que soit l'âge. Le jour du test de rétention, la latence est significativement plus faible chez les rats jeunes que chez les sénescents.

⁴ Les sessions considérées sont: les quatre sessions de conditionnement et le test de rétention.

Enfin, chez les rats jeunes, le temps pour trouver la sortie est significativement plus élevé lors de la première session par rapport aux autres sessions du conditionnement mais aussi par rapport à la session de test.

Lors de ce second apprentissage spatial, nous avons aussi enregistré le nombre d'erreurs de référence au cours des sessions successives de conditionnement (figure 27-B) par une ANOVA à deux voies (le premier facteur correspondant à la session d'apprentissage et le second étant l'âge), suivie d'une comparaison de moyennes par un test de Kramer-Tukey. Nous observons un effet de la session ($F[3,84]= 31,13$; $p<0,05$), un effet de l'âge ($F[2,84]= 3,30$; $p<0,05$), mais pas d'interaction entre ces deux facteurs ($F[6,84]= 0,54$; $p>0,05$). Chez les rats jeunes, le nombre d'erreurs lors de la première session est significativement plus important que ceux notés lors des seconde, troisième et quatrième sessions d'apprentissage. De plus, chez les rats sénescents, le nombre d'erreurs de référence lors de la première session est significativement plus élevé par rapport aux autres sessions de conditionnement.

I.3.c. Comparaison des performances entre le premier et le second apprentissage spatial.

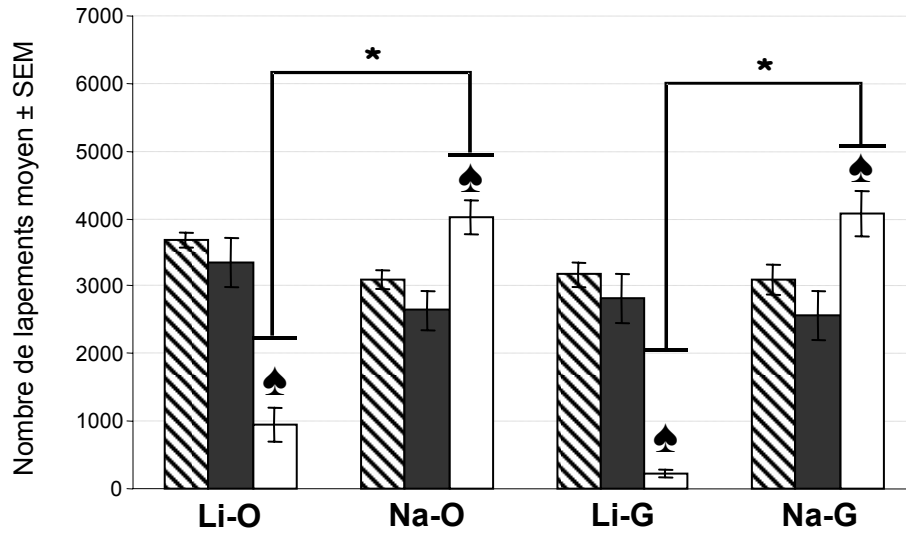
La comparaison par un test du Chi-Deux indique que, quel que soit l'âge considéré, ni les pourcentages de rats ayant acquis la tâche, ni les pourcentages de rats effectuant un rappel correct ne varient pas de façon notable entre le premier et le second apprentissage.

Nous avons examiné les modifications du nombre d'essais nécessaires à l'acquisition lors du premier et lors du second apprentissage par une ANOVA à deux facteurs (un facteur étant l'âge et l'autre facteur étant l'apprentissage, premier ou second). Elle indique un effet significatif de l'âge ($F[2,41]= 6,16$; $p<0,05$) et de l'apprentissage ($F[1,41]= 6,78$; $p<0,05$) mais pas d'interaction entre ces facteurs ($F[2,41]= 1,25$; $p>0,05$). Le test de comparaison des moyennes de Kramer-Tukey montre que, chez les animaux jeunes et adultes, le nombre d'essais nécessaires pour apprendre la localisation correcte de la sortie est significativement diminué entre le premier et le second apprentissage (figure 25).

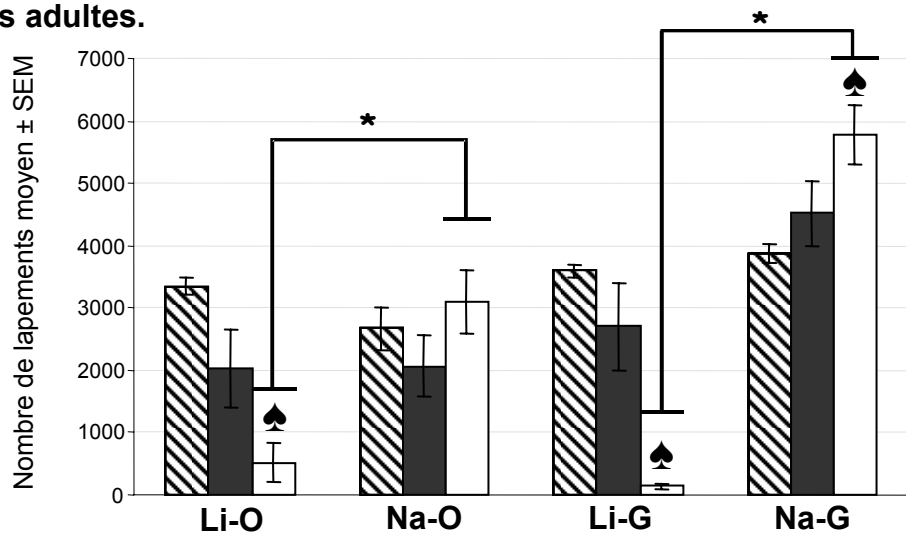
En résumé, nous observons, lors de l'apprentissage de cette tâche spatiale, des perturbations similaires à celles notées lors de la discrimination olfactive. En effet, les rats sénescents sont moins performants: par rapport aux jeunes et aux adultes, ils sont moins nombreux à parvenir à apprendre cette tâche spatiale et un plus grand nombre d'essais leur est nécessaire pour atteindre le critère de réussite de 60%. De plus, leurs performances ne s'améliorent pas de façon significative entre le premier et le second apprentissage. Soulignons que, contrairement à ce que nous avons observé pour la tâche olfactive, le rappel est ici fortement altéré chez les rats sénescents. L'analyse des latences pourrait refléter des modifications motrices liées à l'âge mais aussi des déficits cognitifs proprement dits. De plus, lors du premier apprentissage, les erreurs de référence, dont le nombre pourrait refléter les modifications de la mémoire de travail au cours du vieillissement, ne diminuent pas chez les rats sénescents au cours des sessions. Toutefois, lors du second apprentissage, ce nombre d'erreurs diminue, chez les rats sénescents, lors des sessions successives comme chez les rats jeunes et adultes.

Figure 28: Nombre moyen (\pm SEM) de lapements effectués par les rats jeunes, adultes et sénescents lors de l'acquisition et du rappel de l'AOPG.

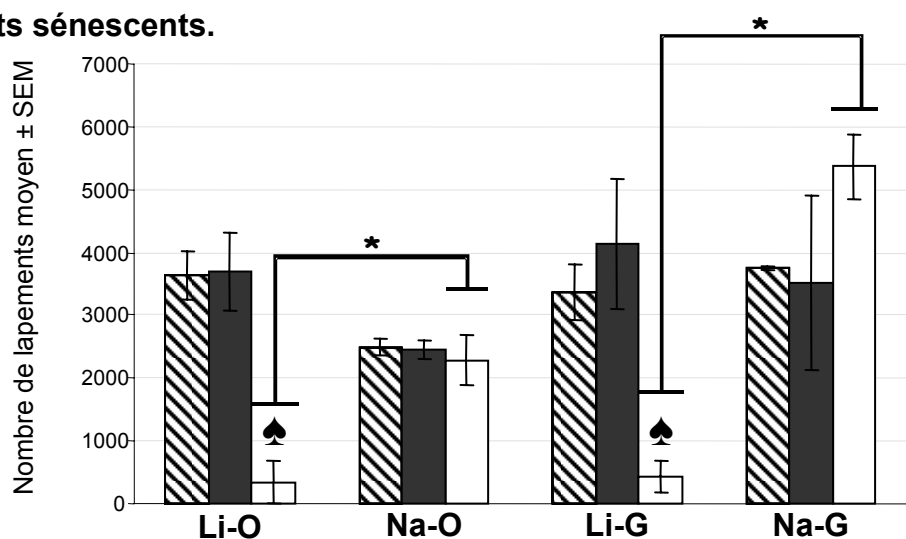
A: Rats jeunes.



B: Rats adultes.



C: Rats sénescents.



Habituation

Acquisition

Rappel

* Différence significative (p<0,05) entre les groupes

♠ Différence significative (p<0,05) entre le jour du test et les autres jours

I.4. Performances des rats jeunes, adultes et sénescents soumis à l'apprentissage et au rappel de l'AOPG.

Tous les rats, y compris ceux qui ne réussissaient pas à acquérir l'une ou/et l'autre des tâches précédentes, sont soumis à l'acquisition et au rappel de l'AOPG. Le jour de l'acquisition de l'AOPG, la présentation simultanée des stimuli olfactif (benzaldéhyde) et gustatif (saccharine de sodium) est suivie, 30 min plus tard, par une injection i.p. de chlorure de lithium induisant un malaise viscéral (groupes des rats conditionnés : Li). Les rats témoins (Na) sont placés dans les mêmes conditions expérimentales mais ne reçoivent qu'une injection i.p. de chlorure de sodium. Pour chaque âge étudié, les animaux, quelles que soient leurs performances dans les tâches précédentes, sont répartis aléatoirement entre les groupes conditionnés et témoins (tableau 11). Deux jours après la session d'acquisition, les rats sont soumis au rappel. Pour chacun d'eux, le nombre de lapements est enregistré lorsque le rat est mis en présence de l'odeur seule (groupes Li-O et Na-O) ou du goût seul (groupes Li-G et Na-G).

Age	Li-O	Na-O	Li-G	Na-G	Total
Jeunes	11	12	11	11	45
Adultes	7	5	4	4	20
Sénescents	7	6	4	2	19

Tableau 11: effectifs des groupes expérimentaux soumis à l'apprentissage et au rappel de l'AOPG.

I.4.a. Comparaison du nombre de lapements chez les rats Li et Na.

Chez les rats jeunes (figure 28-A), nous comparons le nombre de lapements lors de la période d'habituation, du jour de l'acquisition et du rappel par un test t apparié de Student, pour chacun des groupes expérimentaux: Li-O, Na-O, Li-G et Na-G.

Aucune différence significative entre l'habituation et le jour de l'acquisition n'est mise en évidence⁵ quel que soit le groupe expérimental. Par contre, le nombre de lapements le jour du rappel diminue significativement par rapport à l'habituation chez les groupes Li-O ($t(10)=9,43$; $p<0,05$) et Li-G ($t(10)=17,66$; $p<0,05$). De même, il est significativement inférieur à celui noté le jour de l'acquisition chez les rats Li-O ($t(10)=5,94$; $p<0,05$) et Li-G ($t(10)=7,47$; $p<0,05$).

Au contraire, le nombre de lapements le jour du rappel est significativement plus grand que celui enregistré lors de la phase d'habituation chez les groupes Na-O ($t(11)=3,83$; $p<0,05$) et Na-G ($t(10)=2,77$; $p<0,05$). De façon similaire, le nombre de lapements augmente significativement le jour du rappel par rapport au jour de l'acquisition chez les rats Na-O ($t(11)=3,17$; $p<0,05$) et Na-G ($t(10)=6,75$; $p<0,05$).

Une ANOVA à deux voies (le premier facteur étant le groupe expérimental, Li versus Na, et le second étant le stimulus conditionnel présenté lors du rappel, odeur versus goût) suivie d'une comparaison des moyennes par un test de Kramer-Tukey est utilisée pour analyser le nombre de lapements lors de l'acquisition d'une part et lors du rappel d'autre part.

Nous ne notons pas d'effet de l'un ou l'autre des facteurs sur le nombre de lapements le jour de l'acquisition de l'AOPG. Par contre, le jour du rappel, l'ANOVA indique un effet du groupe expérimental ($F[1,41]=191,64$; $p<0,05$), aucun effet du stimulus conditionnel ($F[1,41]=1,86$; $p>0,05$) ni d'interaction entre ces deux facteurs ($F[1,41]=2,38$; $p>0,05$).

Le nombre de lapements chez les rats Li-O le jour du rappel est significativement plus faible que celui noté chez les rats Na-O, il en est de même chez les rats Li-G comparés aux Na-G.

Chez les rats adultes (figure 28-B), nous comparons le nombre de lapements lors de la période d'habituation, le jour de l'acquisition et du rappel par un test t apparié de Student, pour chacun des groupes expérimentaux: Li-O, Na-O, Li-G et Na-G. Aucune différence significative entre l'habituation et le jour de l'acquisition n'est mise en évidence quel que soit le groupe expérimental. En revanche, le nombre de lapements le jour du rappel est significativement diminué par rapport à l'habituation chez les groupes Li-O ($t(6)=7,72$; $p<0,05$) et Li-G ($t(3)=31,34$; $p<0,05$).

⁵ Nous avons choisi de regrouper toutes les comparaisons statistiques dans l'annexe 4. Nous n'avons indiqué dans le texte, afin d'en faciliter la lecture, que les seuls résultats significatifs.

De plus, le nombre de lapements lors du rappel est significativement plus faible que celui de l'acquisition aussi bien chez les rats Li-O ($t(6)=3,18$; $p<0,05$) que chez les rats Li-G ($t(3)=3,9$; $p<0,05$).

Chez les rats Na-O, nous ne notons pas de différence significative du nombre de lapements entre les jours d'acquisition et de rappel. Toutefois, chez les animaux Na-G, le nombre de lapements est significativement plus élevé lors du rappel par rapport à l'habituation ($t(3)=4,77$; $p<0,05$) et à l'acquisition ($t(3)=3,9$; $p<0,05$).

Une ANOVA à deux voies (le premier facteur étant le groupe expérimental et le second étant le stimulus conditionnel présenté lors du rappel) suivie d'une comparaison des moyennes par un test de Kramer-Tukey est utilisée pour analyser le nombre de lapements, d'une part lors de l'acquisition et d'autre part, lors du rappel.

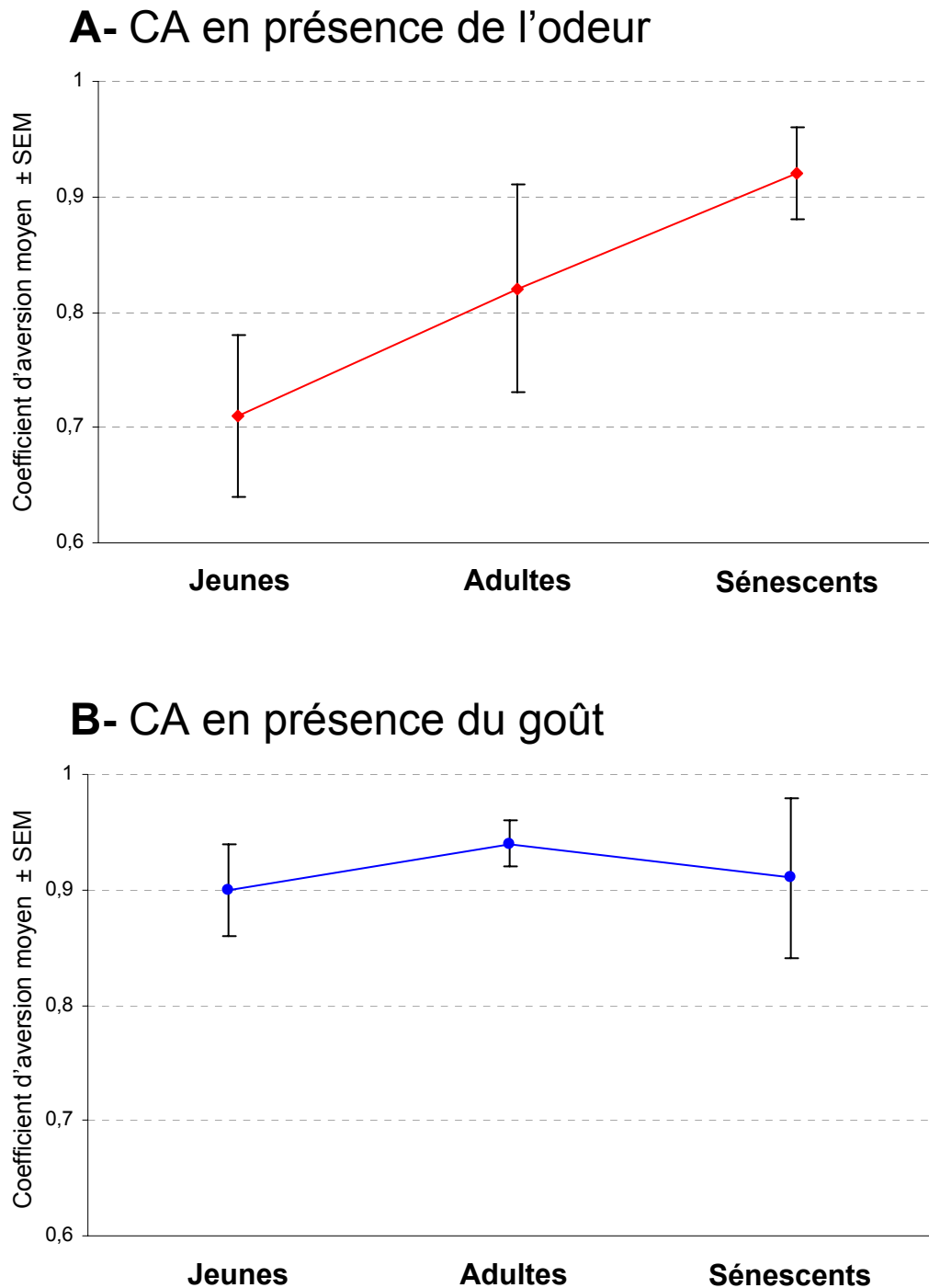
Nous ne notons pas d'effet de l'un ou l'autre des facteurs sur le nombre de lapements le jour de l'acquisition de l'AOPG. Par contre, nous observons un effet significatif du groupe expérimental ($F[1,16]=174,28$; $p<0,05$), du stimulus conditionnel ($F[1,16]= 17,19$; $p<0,05$), et une interaction entre ces deux facteurs ($F[1,16]= 16,09$; $p<0,05$). Le nombre de lapements chez les rats Li-O le jour du rappel est significativement plus faible que celui noté chez les rats Na-O, il en est de même chez les rats Li-G comparés aux rats Na-G.

Chez les rats sénescents (figure 28-C), nous comparons le nombre de lapements lors de la période d'habituation, le jour de l'acquisition et du rappel par un test t apparié de Student, pour chacun des groupes expérimentaux: Li-O, Na-O, Li-G et Na-G. Aucune différence significative entre l'habituation et le jour de l'acquisition n'est mise en évidence quel que soit le groupe expérimental. Par contre, le nombre de lapements le jour du rappel diminue significativement par rapport à celui de l'habituation chez les groupes Li-O ($t(6)=7,86$; $p<0,05$) et Li-G ($t(3)=8,14$; $p<0,05$). De même, il est significativement plus faible le jour du rappel comparé à celui du jour de l'acquisition chez les rats Li-O ($t(6)=4,2$; $p<0,05$) et Li-G ($t(3)=3,61$; $p<0,05$).

Chez les animaux Na-O et Na-G, nous ne notons pas de différence significative entre les jours d'habituation, d'acquisition ou de rappel.

Une ANOVA à deux voies (le premier facteur étant le groupe expérimental et le second étant le stimulus conditionnel présenté lors du rappel) suivie d'une comparaison des

Figure 29: Coefficient d'aversion (CA) en présence de l'odeur (A) ou du goût (B) en fonction de l'âge.



moyennes par un test de Kramer-Tukey est utilisée pour analyser le nombre de lapements lors de l'acquisition d'une part et lors du rappel d'autre part.

Nous ne notons pas d'effet de l'un ou l'autre des facteurs sur le nombre de lapements le jour de l'acquisition de l'AOPG. En revanche, le jour du rappel, l'ANOVA indique un effet significatif du groupe expérimental ($F[1,15]= 153,95$; $p<0,05$), du stimulus conditionnel ($F[1,15]= 22,36$; $p<0,05$), et une interaction entre ces deux facteurs ($F[1,15]= 16,62$; $p<0,05$). La comparaison des moyennes par un test de Kramer-Tukey indique que le nombre de lapements chez les animaux Li-O et Li-G est significativement plus faible par rapport, respectivement, aux témoins Na-O et Na-G.

I.4.b. Comparaison de la force de l'aversion selon l'âge des rats.

Pour comparer la force de l'aversion chez les rats jeunes, les adultes et les sénescents, nous avons calculé le coefficient d'aversion des groupes Li-O et Li-G (Figure 29).

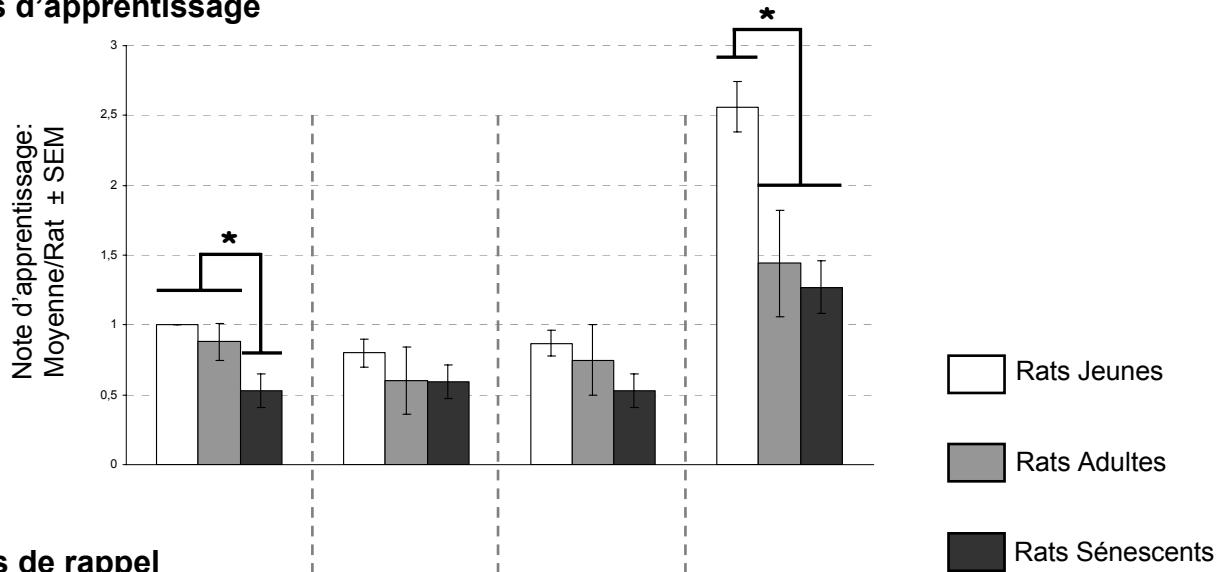
L'ANOVA à deux voies (le premier facteur est le stimulus conditionnel (odeur ou goût), le second facteur est l'âge des animaux) n'indique pas d'effet significatif ni du stimulus conditionnel ($F[1,38]= 3,85$; $p>0,05$) ni de l'âge ($F[2,38]= 3,85$; $p>0,05$) et aucune interaction entre ces facteurs ($F[2,38]= 1,82$; $p>0,05$). Bien que n'étant pas significativement différente, nous remarquons que la force de l'aversion envers l'odeur augmente avec l'âge des animaux, les rats sénescents étant plus aversifs que les jeunes ou les adultes. En présence du goût seul, la force de l'aversion varie peu en fonction de l'âge.

En résumé, quel que soit l'âge, les rats ayant reçu l'injection de LiCl lors de l'acquisition diminuent significativement leur nombre de lapements le jour du rappel aussi bien en présence de l'odeur que du goût. Ces données illustrent le phénomène d'AOPG puisque les animaux ont développé une aversion vis-à-vis des deux stimuli conditionnels. On peut également souligner que tous les rats, quels que soient leurs capacités mnésiques ou leurs âges, sont capables d'apprendre et de se rappeler une AOPG. Les rats ayant reçus une injection de NaCl ne sont aversifs ni à l'odeur ni au goût. Ils montrent même une augmentation de leur nombre de lapements lorsqu'ils sont de nouveau confrontés au goût le jour du rappel, ce qui indiquerait une préférence pour la saccharine.

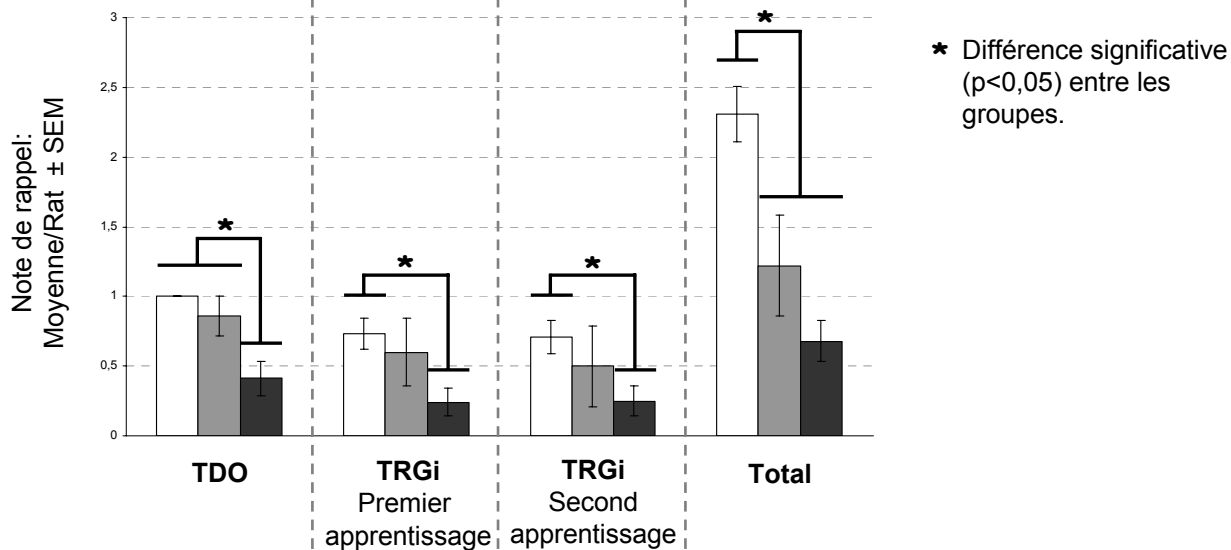
Enfin, bien qu'aucune différence significative du coefficient d'aversion ne soit mise en évidence en fonction de l'âge, nous observons toutefois que la force de l'aversion envers l'odeur augmente avec l'âge.

Figure 30: Évolution des notes d'apprentissage et de rappel pour la TDO et la TRGi et l'ensemble de ces apprentissages (moyenne / rat \pm SEM) pour les trois groupes d'âge étudiés.

A- Notes d'apprentissage



B- Notes de rappel



I.5. Résumé et Conclusion des résultats comportementaux.

Les différents problèmes comportementaux proposés nous ont permis d'estimer les capacités mnésiques de nos animaux en fonction de leur âge. Cette étude montre qu'en vieillissant, les rats ont de plus en plus de difficultés à apprendre les différentes tâches.

Pour mettre en évidence l'effet du vieillissement sur les capacités mnésiques des rats nous avons calculé⁶, en tenant compte de leurs performances dans les tâches de discrimination olfactives et de retour au gîte, deux notes, l'une d'apprentissage et l'autre de rappel, de la façon suivante:

- Note d'apprentissage (NA): nous attribuons 1 point lorsque le rat atteint le critère de réussite, 0 dans le cas contraire. Ainsi, chaque animal peut obtenir au maximum un score de 3 (TDO + premier + second apprentissage de la TRGi). Nous calculons ensuite le score moyen par rat, puis la note moyenne générale par rat pour chaque tranche d'âge.
- Note de rappel (NR): de la même façon, nous créditons de 1 point le rat qui effectue un rappel sans erreur, de 0 s'il se trompe. Le score (3 maximum: TDO + premier + second apprentissage de la TRGi) est ensuite moyenné pour chaque animal. La NR correspond à la moyenne générale des scores par rat pour chaque âge étudié.

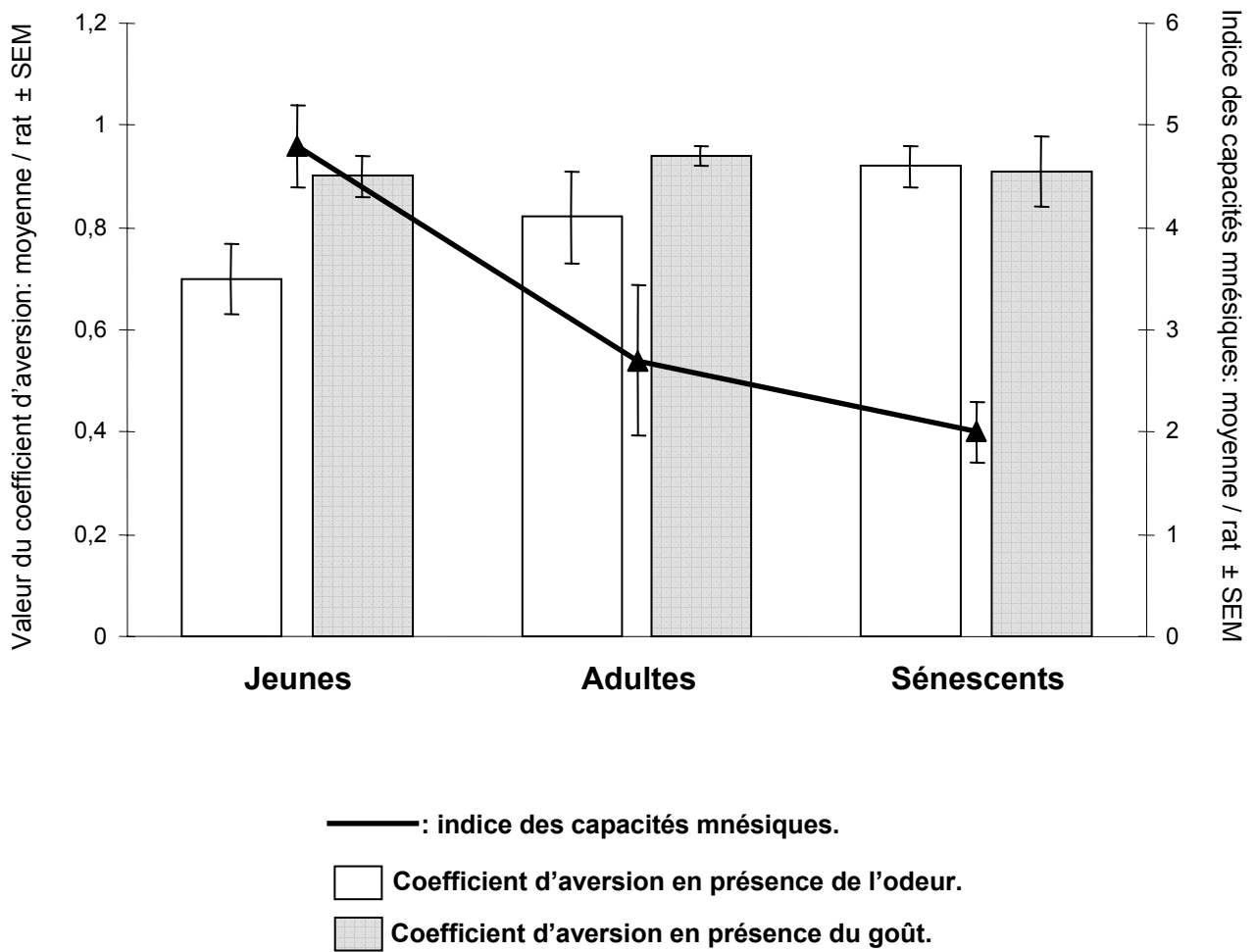
La somme de « NA + NR » définit l'indice des capacités mnésiques (ICM) dont la valeur varie entre 0 et 6 au maximum.

Pour évaluer l'effet de l'âge sur chacune de ces notes, nous avons utilisé une ANOVA à un facteur (l'âge) suivie d'un test de comparaison de moyennes (LSD).

Cette ANOVA indique un effet de l'âge ($F[2,39]= 7.12 ; p<0.05$) seulement sur la NA de la TDO (figure 30-A). Nous observons que cette note, chez les rats jeunes et les adultes est significativement plus élevée que celle des rats sénescents pour la tâche de discrimination

⁶ Nous avons calculé ces notes chez les animaux qui ont réalisés à la fois la tâche de discrimination olfactive et de retour au gîte, soit 16 rats jeunes, 8 rats adultes et 18 rats sénescents.

Figure 31: Évolution de l'indice de capacités mnésiques et du coefficient d'aversion pour les trois groupes d'âge étudiés.



olfactive. Cependant, nous ne constatons aucun effet de l'âge sur cette note pour le premier ($F[2,35]= 0,86 ; p>0,05$) et le second apprentissage ($F[2,33]= 2,26 ; p>0,05$) de la tâche de retour au gîte. Enfin, l'ANOVA indique un effet de l'âge ($F[2,39]= 10.46 ; p<0.05$) sur la NA globale. Celle-ci est significativement plus faible chez les rats adultes et les sénescents que chez les jeunes.

Pour la NR (Figure 30-B), l'analyse statistique révèle un effet significatif de l'âge ($F[2,39]= 11.16 ; p<0.05$) lors du rappel de la TDO, du rappel du premier ($F[2,35]= 4.85 ; p<0.05$) et du second ($F[2,33]= 3.65 ; p<0.05$) apprentissage de la TRG et sur la NR global ($F[2,39] = 11.16 ; p<0.05$). Nous observons que, quelle que soit la tâche considérée, la NR chez les animaux jeunes est significativement plus élevée que celle des sénescents. Enfin, nous remarquons que la NR globale est significativement plus petite chez les adultes et les sénescents que chez les jeunes.

La figure 31 illustre l'ICM, et son évolution, au cours du vieillissement. Nous remarquons que, plus l'âge avance, plus l'ICM diminue, et ce résultat est très significatif comme l'indique une corrélation de Spearman (facteur de corrélation = $-0.61 ; p<0.05$).

Au terme de cette approche comportementale, il apparaît que le vieillissement des animaux s'accompagne, lors de l'apprentissage et du rappel, d'une diminution des capacités mnésiques. Comme le montrent la NA et la NR cette perturbation est plus marquée lors du rappel. Toutefois, tous les rats, quelles que soient leurs capacités mnésiques, restent capables d'acquérir une AOPG et manifestent une forte aversion pour l'odeur et le goût conditionnés lors du rappel de cette AOPG. Soulignons que l'aversion envers l'odeur augmente avec l'âge, tandis que celle pour le goût reste similaire dans les trois groupes considérés. Ainsi, l'AOPG est un apprentissage qui échappe aux effets délétères du vieillissement s'exerçant sur les apprentissages discriminatifs ou spatiaux.

**II. Comparaison des motifs
d'activation cérébrale évoqués
par l'odeur ou le goût lors du
rappel de l'AOPG chez des rats
jeunes, adultes ou sénescents :
étude par détection
immunocytochimique des
protéines Fos et Zif268.**

Nous avons choisi la détection immunocytochimique des protéines Fos et Zif268 afin de cartographier l'activation cérébrale induite par le rappel de l'AOPG, soit en présence du stimulus olfactif (benzaldéhyde), soit en présence du stimulus gustatif (saccharine). Comme le montrent nos données comportementales, les rats stimulés par l'odeur et le goût lors de l'acquisition puis recevant l'injection de LiCl développent une aversion envers ces deux stimuli. Au contraire, les rats témoins (Na), confrontés eux aussi à l'odeur et au goût, mais ne recevant qu'une injection de NaCl, ne deviennent pas aversifs. Nous avons aussi utilisé des rats contrôles de base (C), qui restent dans leurs cages d'habitation. Ils permettent de déterminer les niveaux de base des expressions de Fos et de Zif268 en dehors de toute manipulation expérimentale.

Les motifs d'activation cérébrale induits par le rappel de l'AOPG ont été analysés chez des rats jeunes, des adultes et des sénescents.

II.1. Etude de l'activation cérébrale induite par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG chez les jeunes rats⁷ (1,5 mois).

*Les données rapportées dans ce paragraphe II.1 font l'objet d'un article accepté pour publication dans *Neurobiology of Learning and Memory* (annexe 6).*

II.1.A. Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Fos.

II.1.A.a. Expression de Fos chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base. (Figure 32)

Nous effectuons une ANOVA à un facteur (le groupe expérimental), suivie d'un test de Dunnett, afin d'examiner s'il existe un effet de la manipulation expérimentale sur le nombre de cellules immunoréactives à la protéine Fos chez les rats Li (Li-O ou Li-G) ou Na (Na-O ou Na-G) par rapport aux contrôles de base (C). Afin d'alléger la présentation des résultats, les valeurs statistiques sont regroupées dans le tableau 12.

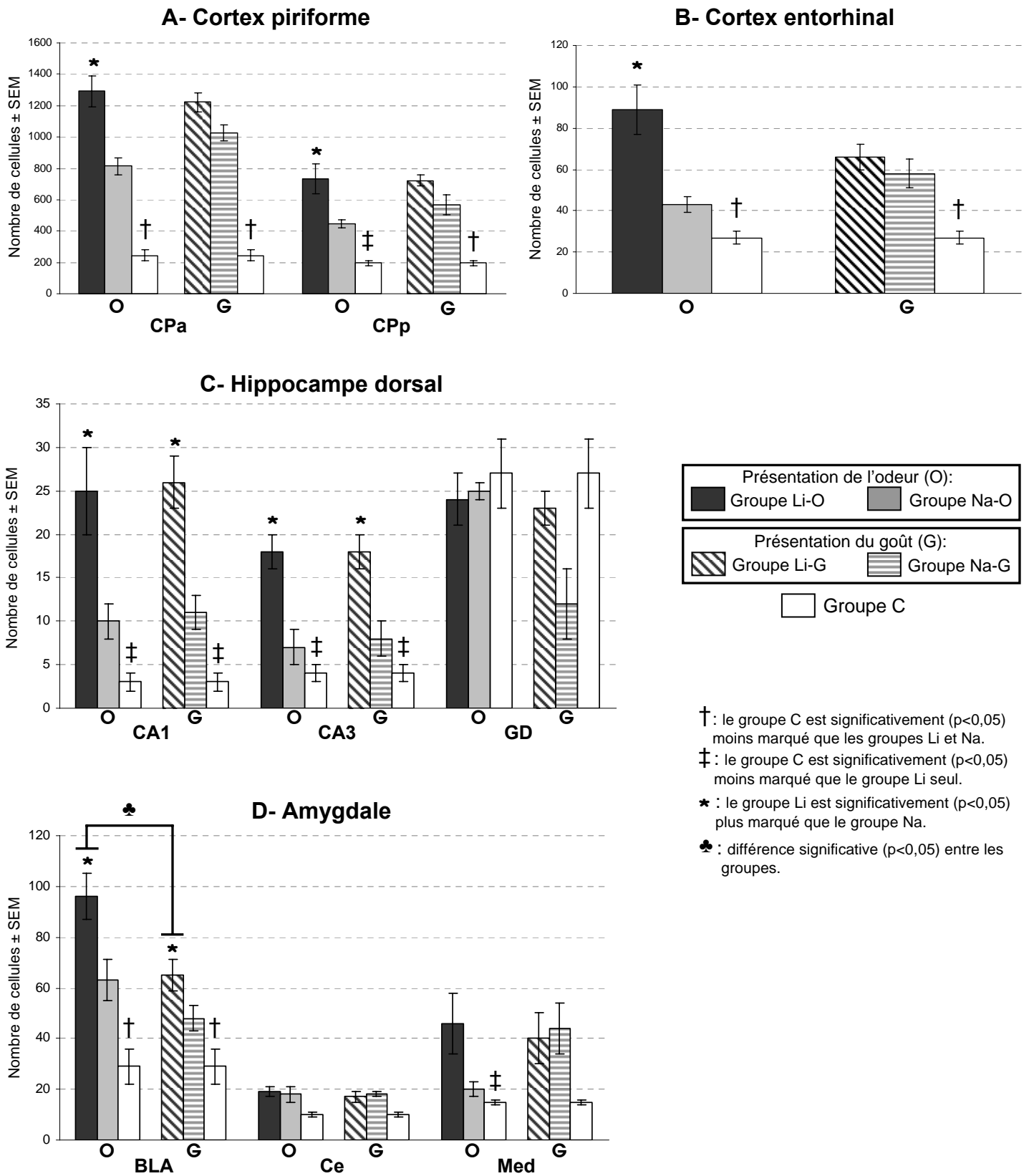
L'ANOVA à un facteur indique un effet des conditions expérimentales sur l'expression de Fos (tableau 12) dans la majorité des régions étudiées, à l'exception du gyrus denté et du noyau central de l'amygdale lors de la stimulation par le goût et l'odeur, et du noyau médian de l'amygdale lors de la stimulation par le goût.

Dans toutes les structures où il y existe un effet significatif des conditions expérimentales, les rats Li-O ainsi que les rats Li-G présentent une expression de Fos significativement ($p < 0,05$) plus forte que les rats C.

Le nombre de cellules immunoréactives chez les rats Na-O n'augmente significativement, par rapport aux rats C, que dans le cortex piriforme antérieur, le cortex entorhinal, le noyau basolatéral de l'amygdale, et le cortex orbito-frontal.

⁷ Les effectifs des animaux dont les coupes cérébrales ont été analysées ainsi que le résumé des analyses statistiques sont indiqués l'annexe 5.

Figure 32: Expression de Fos chez les rats jeunes (1,5 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût



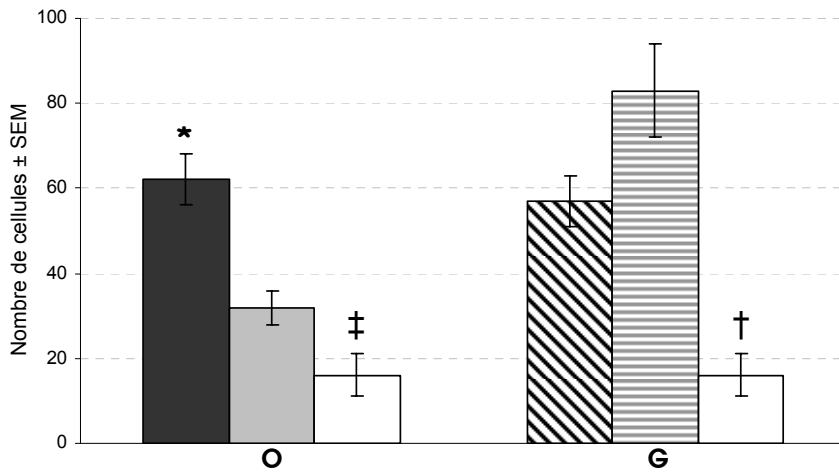
Enfin, l'expression de Fos chez les animaux Na-G est significativement plus forte que chez les rats C dans les deux subdivisions du cortex piriforme, le cortex entorhinal, le noyau basolatéral de l'amygdale, le cortex insulaire et le cortex orbito-frontal.

Structures	Rappel en présence de l'odeur	Rappel en présence du goût
CPa	F [2,14]= 30,87 ; p<0,05	F [2,15]= 44,37 ; p<0,05
CPp	F [2,14]= 11,88 ; p<0,05	F [2,15]= 19,37 ; p<0,05
CE	F [2,14]= 12,13 ; p<0,05	F [2,15]= 5,24 ; p<0,05
CA1	F [2,11]= 16,33 ; p<0,05	F [2,15]= 4,98 ; p<0,05
CA3	F [2,11]= 11,57 ; p<0,05	F [2,15]= 7,96 ; p<0,05
GD	NS	NS
BLA	F [2,13]= 13,19 ; p<0,05	F [2,13]= 6,99 ; p<0,05
Ce	NS	NS
Med	F [2,14]= 6,37 ; p<0,05	NS
CI	F [2,12]= 13,92 ; p<0,05	F [2,14]= 10,07 ; p<0,05
COF	F [2,14]= 21,56 ; p<0,05	F [2,15]= 33,9 ; p<0,05
CPFm	F [2,10]= 24,27 ; p<0,05	F [2,13]= 5,38 ; p<0,05

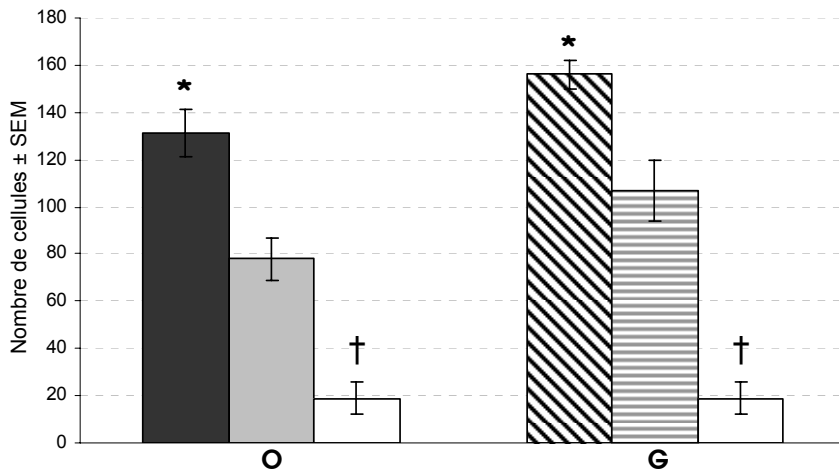
Tableau 12: Résultats de l'ANOVA à un facteur: effet des conditions expérimentales sur l'expression de Fos lors du rappel de l'AOPG chez les rats jeunes. (**NS**: non significatif).

Figure 32 suite: Expression de Fos chez les rats jeunes (1,5 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût.

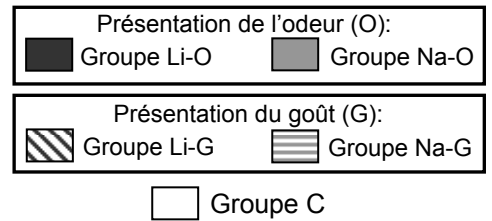
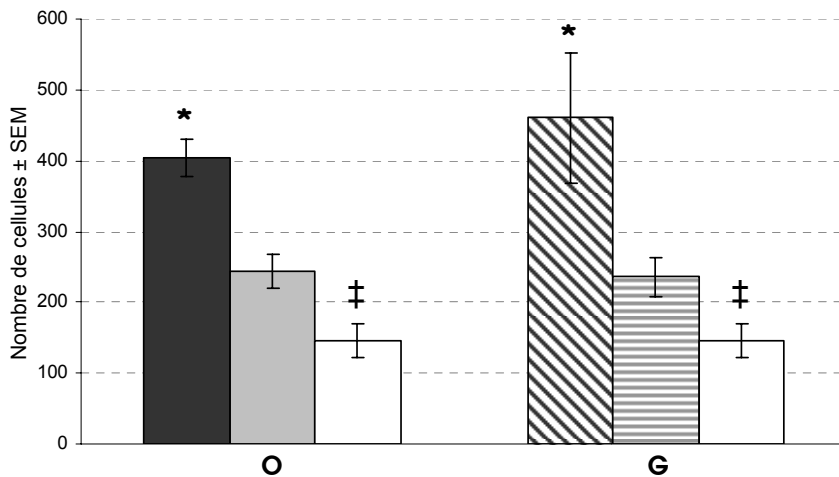
E- Cortex insulaire



F- Cortex orbito-frontal



G- Cortex préfrontal médian



† : le groupe C est significativement ($p < 0,05$) moins marqué que les groupes Li et Na.
 ‡ : le groupe C est significativement ($p < 0,05$) moins marqué que le groupe Li seul.
 * : le groupe Li est significativement ($p < 0,05$) plus marqué que le groupe Na.
 ♣ : différence significative ($p < 0,05$) entre les groupes.

II.1.A.b. Comparaison de l'expression de Fos chez les rats Li et Na stimulés par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG.

Pour chaque structure étudiée, nous avons effectué une ANOVA à deux facteurs (l'un étant le stimulus conditionnel présenté le jour du rappel, c'est à dire odeur ou goût; l'autre étant le groupe expérimental, c'est-à-dire rats Li ou Na) suivie d'un test de comparaison de moyenne (Kramer-Tukey).

- **Cortex piriforme.**

Dans le cortex piriforme antérieur (Figure 32-A), l'ANOVA ne signale pas d'effet du stimulus conditionnel mais un effet du groupe expérimental ($F[1,25]= 26,43$; $p<0,05$) et une interaction entre les deux facteurs étudiés ($F[1,25]= 5,72$; $p<0,05$). Dans le cortex piriforme postérieur, l'ANOVA indique seulement un effet du groupe expérimental ($F[1,25]= 13,92$; $p<0,05$).

Dans les deux subdivisions du CP, l'expression de Fos est significativement ($p<0,05$) plus élevée chez les animaux Li-O comparés aux Na-O. Par contre, nous ne notons pas de différence significative entre les groupes expérimentaux lorsque le goût est présenté lors du rappel.

- **Cortex entorhinal.**

L'ANOVA indique un effet du groupe expérimental ($F[1,25]= 11,72$; $p<0,05$) mais pas du stimulus conditionnel (Figure 32-B et 33). De plus, il existe une interaction entre ces facteurs ($F[1,25]= 5,32$; $p<0,05$).

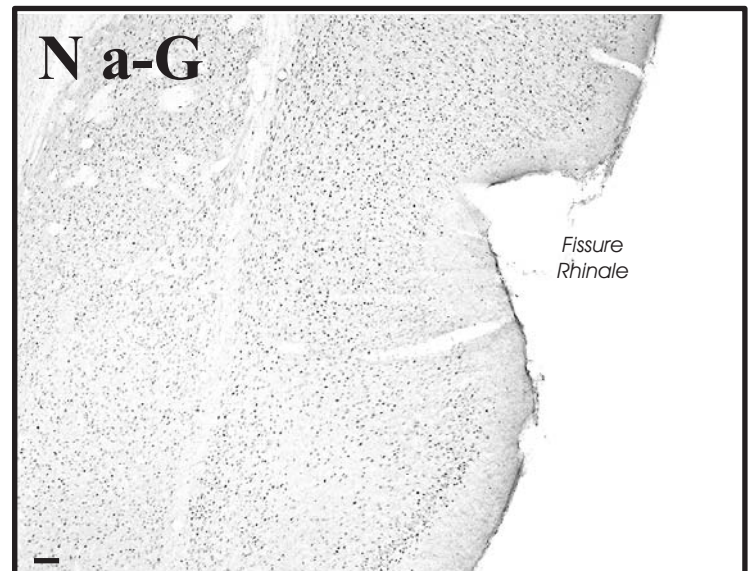
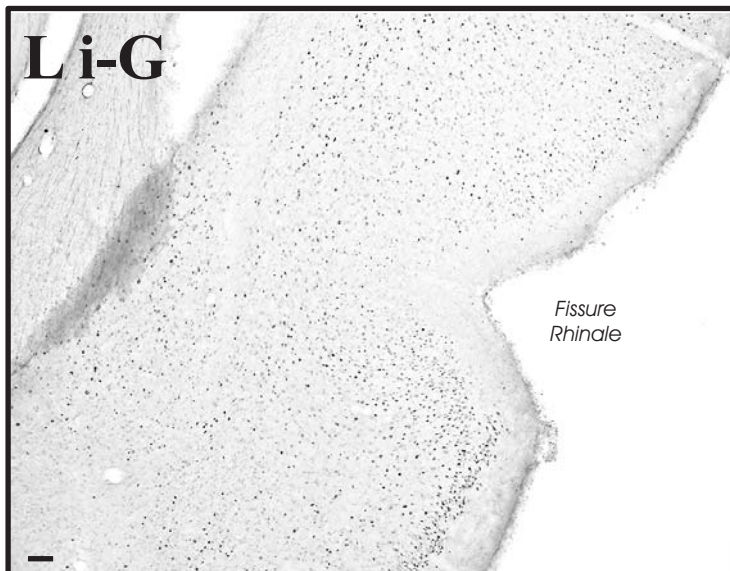
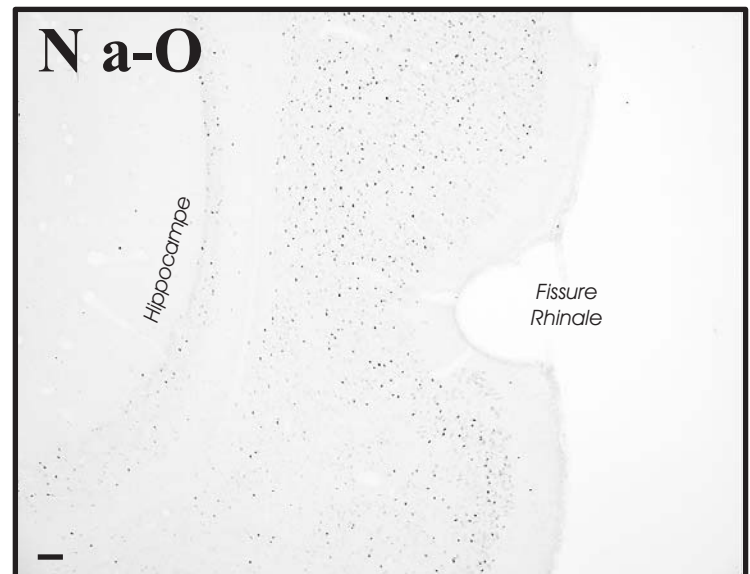
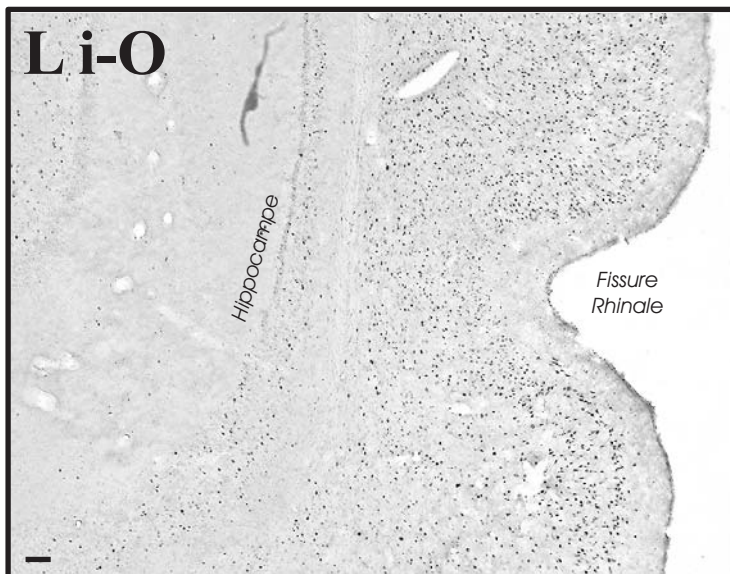
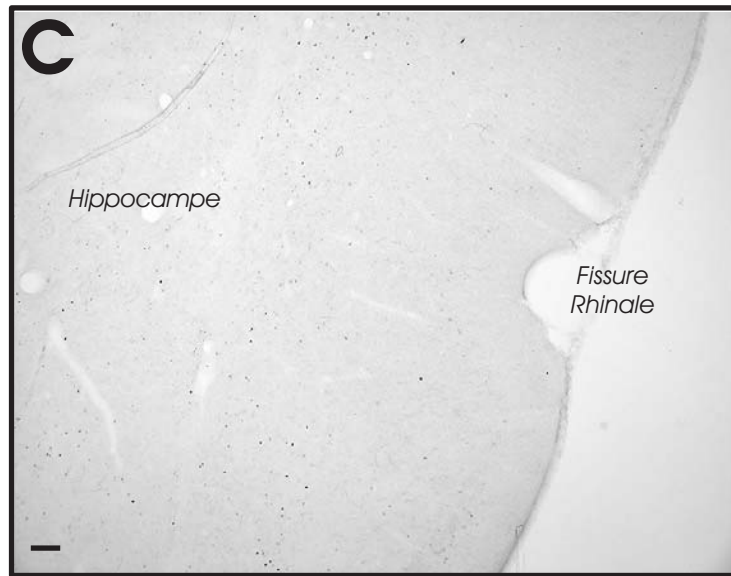
Nous observons que le nombre de cellules exprimant Fos est significativement ($p<0,05$) plus important chez les rats Li-O que chez les rats Na-O (Figure 32-B). Par contre, l'expression de Fos n'est pas significativement différente chez les rats Li-G comparés aux rats Na-G.

- **Hippocampe dorsal.**

L'ANOVA révèle seulement un effet du facteur groupe expérimental sur l'expression de Fos dans les champs CA1 ($F[1,22]= 13,33$; $p<0,05$) et CA3 ($F[1,22]= 18,82$; $p<0,05$).

Figure 33: Illustration du marquage Fos observé dans le cortex entorhinal chez des rats jeunes (1,5 mois) lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût seul.

Les microphotographies de la région entorhinale latérale à grossissement x5, la barre représente 1 mm.



Dans ces deux régions, le nombre de cellules immunoréactives est significativement ($p < 0,05$) plus important chez les rats Li-O et Li-G comparés respectivement aux rats Na-O et Na-G (Figure 32-C). Par contre, dans le GD, nous ne notons aucune différence significative entre les groupes expérimentaux.

- **Amygdale.**

Dans le noyau basolatéral, l'ANOVA montre un effet du groupe expérimental ($F[1,22] = 13,28$; $p < 0,05$) et un effet du stimulus conditionnel ($F[1,22] = 11,10$; $p < 0,05$), mais pas d'interaction entre ces facteurs.

Le nombre de cellules immunoréactives est significativement ($p < 0,05$) plus important chez les rats Li-O et Li-G comparés respectivement aux rats Na-O et Na-G (Figure 32-D). De plus, l'expression de Fos est significativement ($p < 0,05$) plus forte chez les rats Li-O par rapport aux rats Li-G.

Dans les noyaux médian et central, nous n'observons aucun changement significatif de l'expression de Fos.

- **Cortex insulaire.**

L'ANOVA révèle un effet du groupe expérimental ($F[1,22] = 7,29$; $p < 0,05$), un effet du stimulus conditionnel ($F[1,22] = 8,98$; $p < 0,05$) et une interaction entre ces facteurs ($F[1,22] = 12,98$; $p < 0,05$).

L'expression de Fos est significativement ($p < 0,05$) plus importante chez les rats Li-O que chez les Na-O. Cependant, nous ne mettons pas en évidence de différence significative du nombre de cellules immunoréactives entre les rats Li-G et Na-G (Figure 32-E).

- **Cortex orbito-frontal.**

L'ANOVA montre, sur l'expression de Fos, un effet du groupe expérimental ($F[1,25] = 25,39$; $p < 0,05$) et un effet du stimulus conditionnel ($F[1,25] = 9,46$; $p < 0,05$) mais pas d'interaction entre ces deux facteurs considérés.

Le nombre de cellules exprimant Fos est significativement ($p < 0,05$) plus important chez les rats Li-O et Li-G comparés respectivement aux rats Na-O et Na-G (Figure 32-F).

- **Cortex préfrontal médian.**

L'ANOVA indique seulement un effet du groupe expérimental ($F[1,19]= 10,97$; $p<0,05$). L'expression de Fos est significativement ($p<0,05$) plus forte chez les rats Li-O et Li-G comparés respectivement aux rats Na-O et Na-G (Figure 32-G).

En résumé, l'analyse de l'expression de Fos lors du rappel de l'AOPG fait apparaître des motifs différents selon que le rappel de l'aversion est induit par l'odeur ou le goût (Tableau 13). Nous remarquons qu'aucune des régions considérées ne montre une activation spécifique lorsque le rappel de l'AOPG est évoqué en présence du goût. Si certaines régions, CA1, CA3, BLA, COF et CPFm, s'activent quel que soit le stimulus présenté lors du rappel de l'AOPG, d'autres, au contraire, le CP, le CE et le CI, ne montrent une modification significative de l'expression de Fos que lorsque l'odeur est présentée pour induire le rappel de l'AOPG. De plus, nous notons une activation différentielle du BLA significativement plus importante en présence de l'odeur que du goût. Ainsi, la présentation de l'odeur aversive active un réseau plus vaste que celui mis en jeu par le goût.

Tableau 13: Structures présentant une modification significative de l'expression de Fos lors du rappel de l'AOPG chez les rats jeunes.

		Structures activées							
Odeur seule	CPa	CPp	BLA	CE	CA1	CA3	COF	CPFm	CI
Goût seul			BLA		CA1	CA3	COF	CPFm	

Les structures activées en présence de l'odeur mais aussi en présence du goût sont encadrées en bleu.

II.1.B. Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Zif268⁸.

II.1.B.a. Expression de Zif268 chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base. (Figure 34)

Afin d'examiner s'il existe un effet de la manipulation expérimentale sur le nombre de cellules immunoréactives à la protéine Zif268 chez les rats Li (Li-O ou Li-G) ou Na (Na-O ou Na-G) par rapport aux contrôles de base (C), nous effectuons une ANOVA à un facteur (la condition expérimentale), suivie d'un test de Dunnett. Afin d'alléger la présentation des résultats, les valeurs statistiques sont regroupées dans le tableau 14.

L'ANOVA à un facteur indique un effet des conditions expérimentales sur l'expression de Zif268 (Tableau 14) dans la majorité des régions étudiées, à l'exception du cortex entorhinal et du gyrus denté lors de la stimulation par le goût ou par l'odeur, et du noyau médian lors de la stimulation par le goût.

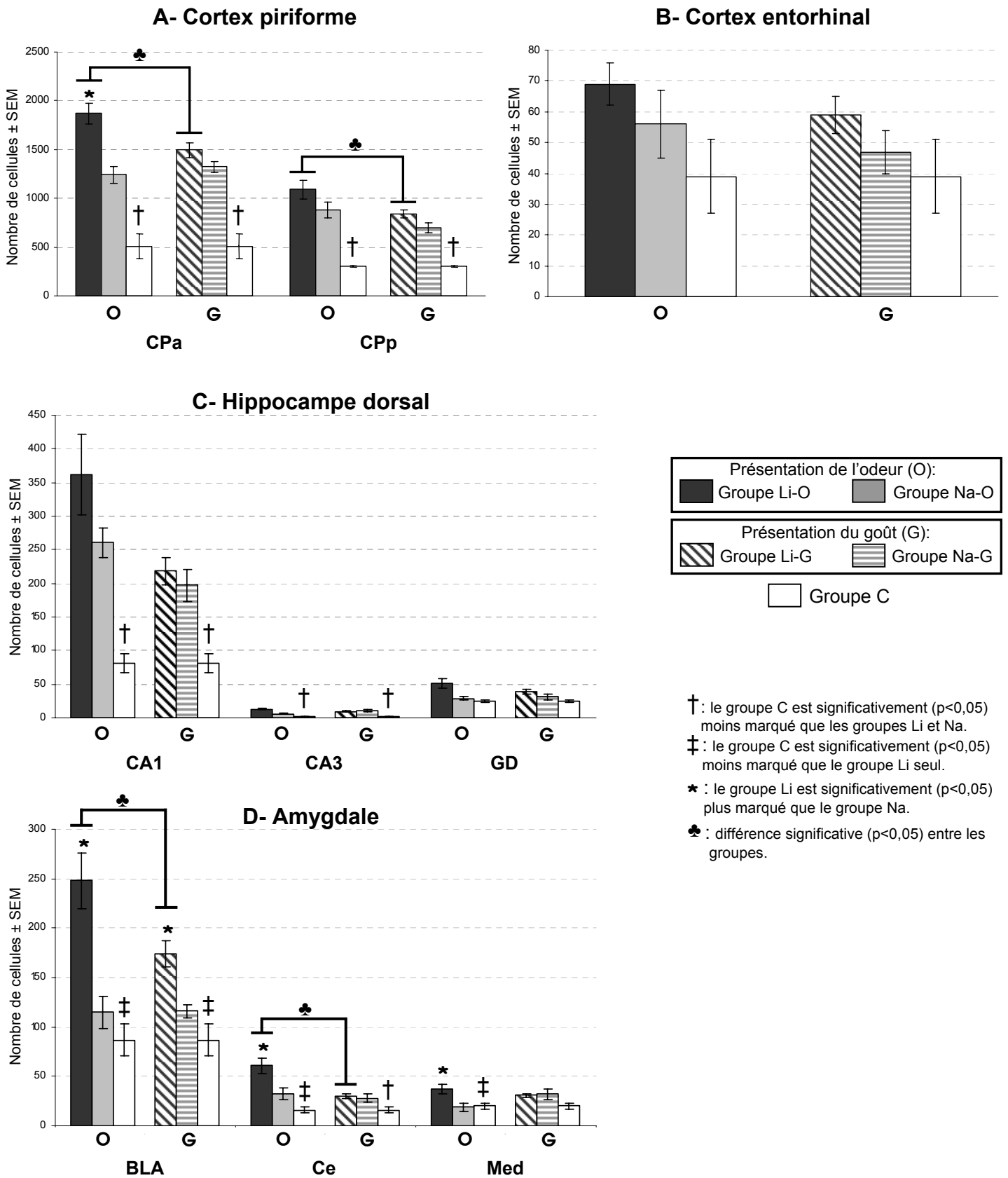
Dans toutes les structures où nous observons un effet significatif des conditions expérimentales, les rats Li-O, ainsi que les Li-G, présentent tous une expression de Zif268 significativement ($p < 0,05$) plus forte que celle notée chez les C.

Chez les animaux Na-O, le nombre de cellules immunoréactives à Zif268 significativement augmenté comparés aux rats C seulement dans le cortex piriforme, les champs CA1 et CA3 de l'hippocampe, le cortex insulaire, le cortex orbito-frontal et le cortex préfrontal médian.

Enfin, le marquage Zif268 est significativement plus important chez les animaux Na-G que chez les rats C dans le cortex piriforme, le noyau central de l'amygdale, les champs CA1 et CA3 de l'hippocampe, le cortex insulaire, le cortex orbito-frontal et le cortex préfrontal médian.

⁸ Les effectifs des animaux pris en compte lors de l'analyse des coupes cérébrales sont indiqués ainsi que le résumé des analyses statistiques sont présentés dans l'annexe 7.

Figure 34: Expression de Zif268 chez les rats jeunes (1,5 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût



Structures	Rappel en présence de l'odeur	Rappel en présence du goût
CPa	F [2,13]= 22,7 ; p<0,05	F [2,14]= 39,3 ; p<0,05
CPp	F [2,13]= 14,62 ; p<0,05	F [2,14]= 38,16 ; p<0,05
CE	NS	NS
CA1	F [2,13]= 16,84 ; p<0,05	F [2,14]= 11,87 ; p<0,05
CA3	F [2,13]= 11,32 ; p<0,05	F [2,14]= 4,95 ; p<0,05
GD	NS	NS
BLA	F [2,10]= 245,14 ; p<0,05	F [2,13]= 14,97 ; p<0,05
Ce	F [2,10]= 173,72 ; p<0,05	F [2,13]= 6,42 ; p<0,05
Med	F [2,11]= 4,57 ; p<0,05	NS
CI	F [2,11]= 5,54 ; p<0,05	F [2,14]= 63,35 ; p<0,05
COF	F [2,11]= 8,73 ; p<0,05	F [2,14]= 4,85 ; p<0,05
CPFm	F [2,10]= 10,24 ; p<0,05	F [2,10]= 47,58 ; p<0,05

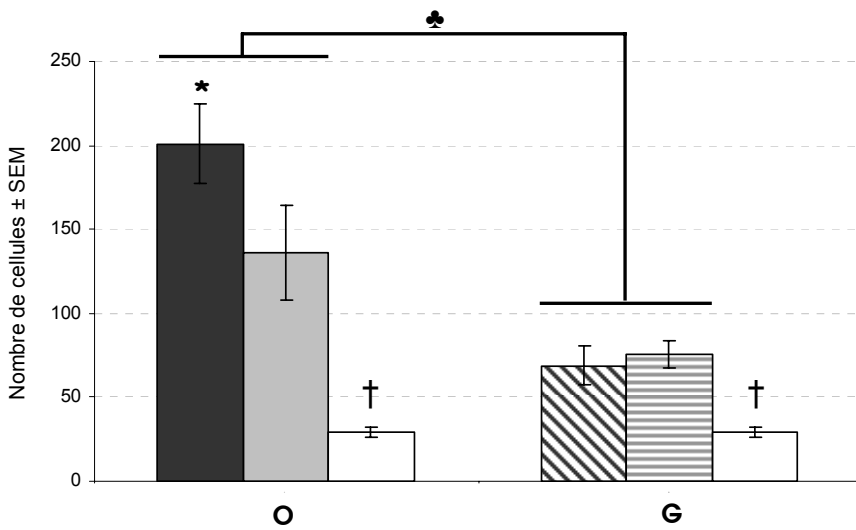
Tableau 14: Résultats de l'ANOVA à un facteur: effet des conditions expérimentales sur l'expression de Zif268 lors du rappel de l'AOPG chez les rats jeunes. (NS: non significatif).

II.1.B.b. Comparaison de l'expression de Zif268 chez les animaux Li et Na stimulés par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG.

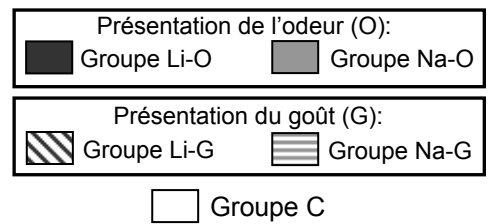
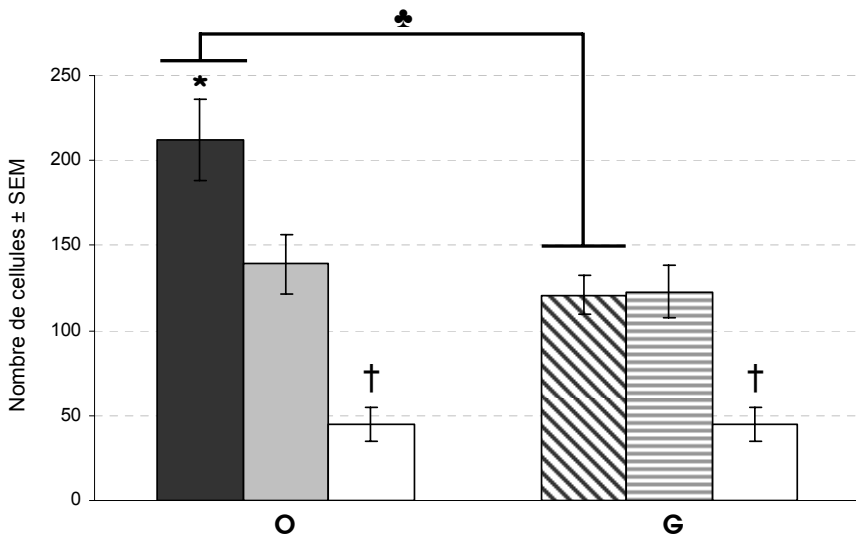
Pour chacune des structures étudiées, nous avons effectué une ANOVA à deux facteurs (l'un étant le stimulus conditionnel présenté le jour du rappel, c'est à dire odeur ou goût; l'autre

Figure 34 suite: Expression de Zif268 chez les rats jeunes (1,5 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût.

E- Cortex insulaire

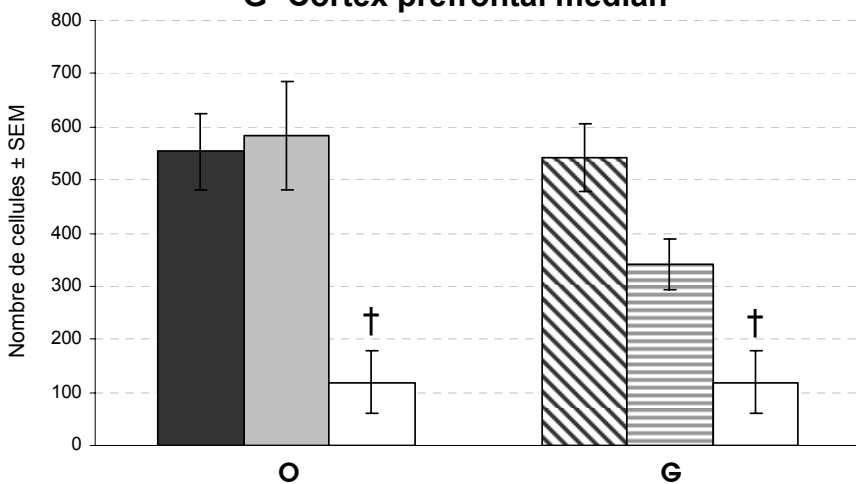


F- Cortex orbito-frontal



† : le groupe C est significativement ($p < 0,05$) moins marqué que les groupes Li et Na.
 ‡ : le groupe C est significativement ($p < 0,05$) moins marqué que le groupe Li seul.
 * : le groupe Li est significativement ($p < 0,05$) plus marqué que le groupe Na.
 ♣ : différence significative ($p < 0,05$) entre les groupes.

G- Cortex préfrontal médian



étant le groupe expérimental, c'est-à-dire Li ou Na) suivie d'un test de comparaison de moyenne (Kramer-Tukey).

- **Cortex piriforme.**

Dans le cortex piriforme antérieur (Figure 34-A), l'ANOVA ne signale pas d'effet du stimulus conditionnel mais un effet du groupe expérimental ($F[1,23]= 18,66$; $p<0,05$) et une interaction entre les deux facteurs étudiés ($F[1,23]= 6,02$; $p<0,05$). Dans le cortex piriforme postérieur, l'ANOVA indique un effet du groupe expérimental ($F[1,23]= 10,07$; $p<0,05$) et un effet du stimulus conditionnel ($F[1,23]= 15,39$; $p<0,05$) mais nous ne notons pas d'interaction entre ces facteurs.

Nous observons que le groupe Li-O est significativement plus marqué que le groupe Na-O uniquement dans la région antérieure du CP. Par contre, la stimulation par le goût ne modifie pas l'expression de Zif268 entre les rats Li-G et Na-G que ce soit dans le CPa ou le CPp. D'autre part, nous remarquons que les animaux Li-O sont significativement plus marqués que les Li-G à la fois dans le CPa et le CPp.

- **Cortex entorhinal.**

L'ANOVA n'indique aucun effet significatif des deux facteurs considérés sur l'expression de Zif268 lors du rappel de l'AOPG (figure 34-B).

- **Hippocampe.**

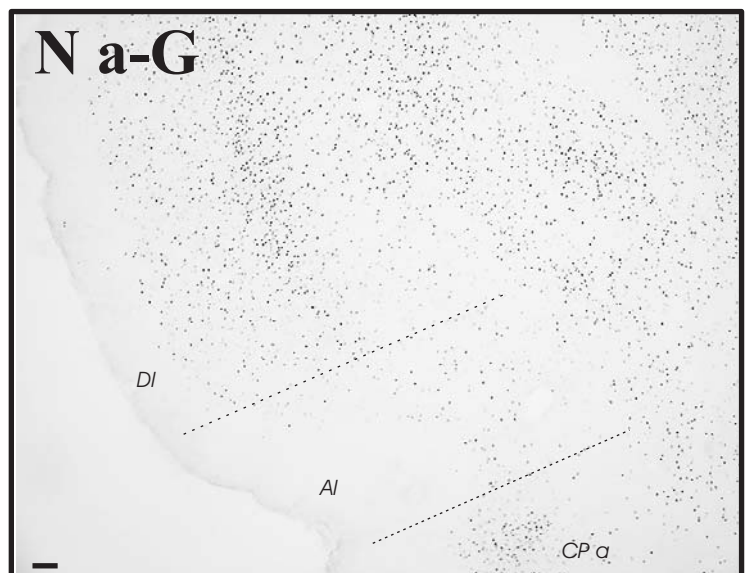
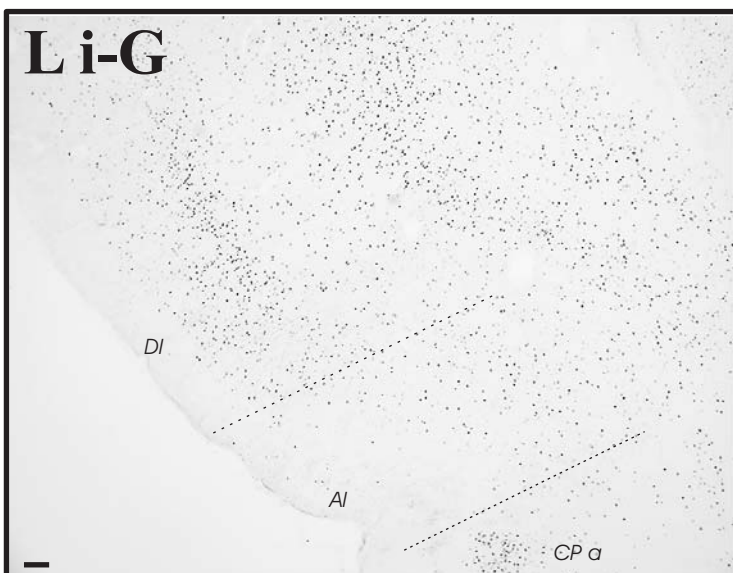
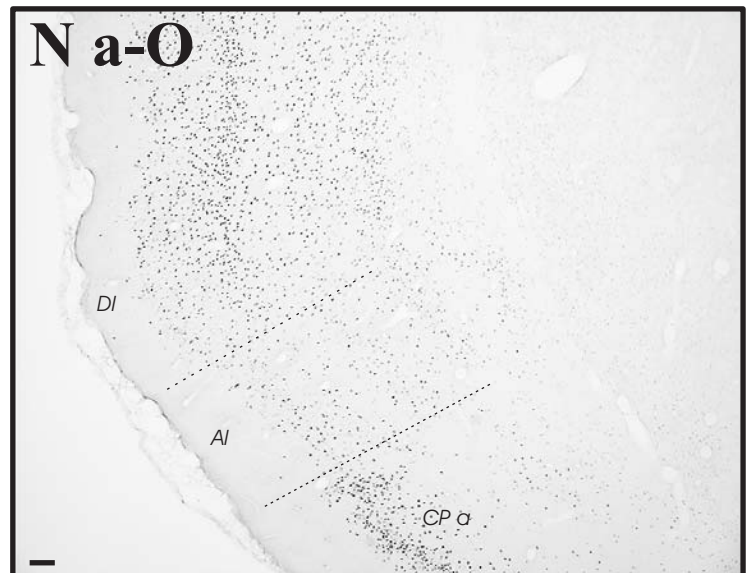
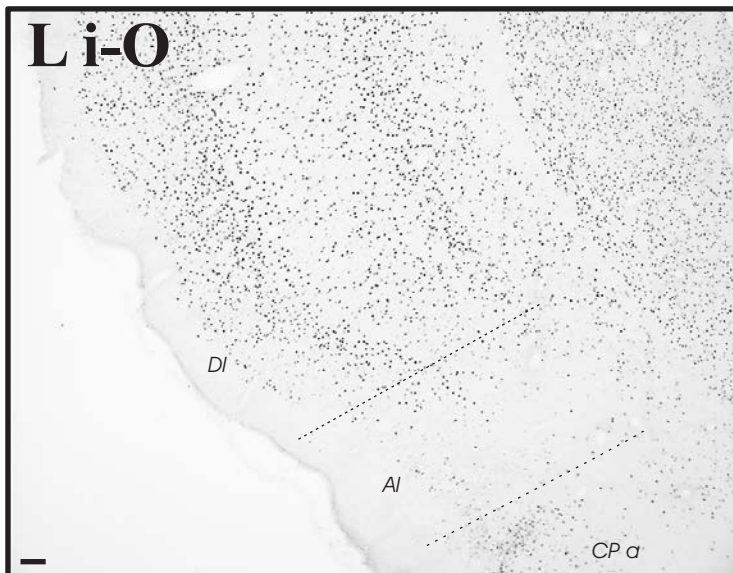
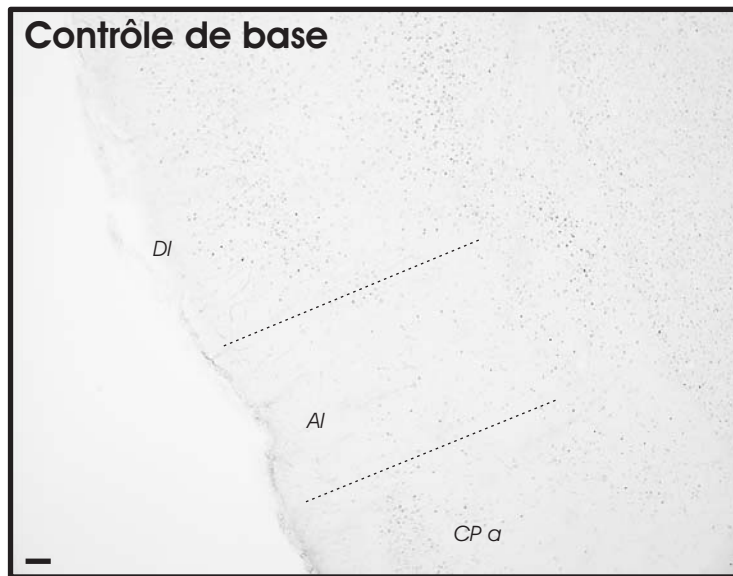
Dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe et le GD (Figure 34-C), l'ANOVA ne montre pas d'effet significatif ni du stimulus conditionnel, ni du groupe expérimental, ni d'interaction sur l'expression de Zif268.

- **Amygdale.**

Dans le noyau basolatéral, l'ANOVA signale un d'effet du stimulus conditionnel ($F[1,19]= 4,97$; $p<0,05$), un effet du groupe expérimental ($F[1,19]= 33,26$; $p<0,05$) et une interaction entre ces facteurs ($F[1,19]= 5,04$; $p<0,05$). Le groupe Li est significativement plus marqué que le groupe Na, que le rappel ait lieu en présence de l'odeur ou du goût (figure 34-D). De plus, l'expression de Zif268 est significativement plus importante chez les animaux Li-O que chez les Li-G.

Figure 35: Expression de Zif268 observée dans le cortex insulaire chez des rats jeunes (1,5 mois) lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût seul.

Microphotographies du cortex insulaire au grossissement x5, la barre représente 1mm.



CP α : Cortex piriforme antérieur

AI: région agranulaire du cortex insulaire

DI: région dysgranulaire du cortex insulaire

Dans le noyau central, l'ANOVA indique un effet du stimulus conditionnel ($F[1,19]=12,4$; $p<0,05$), un effet du groupe expérimental ($F[1,19]=9,64$; $p<0,05$) et également une interaction entre ces facteurs ($F[1,19]=7,82$; $p<0,05$). Le nombre de cellules marquées est significativement plus important chez les rats Li-O comparés aux Na-O (figure 34-D). De plus, le marquage du groupe Li-O est significativement plus important que celui du groupe Li-G.

Dans le noyau médian, l'ANOVA indique seulement un effet du groupe expérimental ($F[1,20]=4,27$; $p<0,05$) et une interaction entre les facteurs considérés ($F[1,19]=5,69$; $p<0,05$). Alors que le nombre de cellules exprimant Zif268 est significativement plus grand chez les rats Li-O comparés aux Na-O, nous ne notons pas de différence chez les animaux stimulés par le goût (figure 34-D).

- **Cortex insulaire.**

Dans ce cortex (figure 35), l'ANOVA met en évidence, sur l'expression de Zif268, un effet du stimulus conditionnel ($F[1,20]=31,58$; $p<0,05$), du groupe expérimental ($F[1,20]=11,59$; $p<0,05$) mais pas d'interaction entre ces facteurs. Les animaux Li-O sont significativement plus marqués que les Na-O. Par contre, nous n'observons pas de différence lorsque les animaux sont stimulés par le goût (figure 34-E). De plus, le marquage est respectivement plus important chez les rats Li-O et les Na-O que chez Li-G et les Na-G.

- **Cortex orbito-frontal.**

Dans cette région, l'ANOVA indique un effet du stimulus conditionnel ($F[1,23]=9,68$; $p<0,05$), pas d'effet du groupe expérimental et une interaction entre ces facteurs ($F[1,23]=4,74$; $p<0,05$).

Les rats Li-O présentent un nombre de cellules immunoréactives significativement plus important que les Na-O. Par contre, la présentation du goût ne modifie pas l'expression de Zif268 (figure 34-F). D'autre part, le marquage observé chez les rats Li-O est significativement plus grand que celui des Li-G.

- **Cortex préfrontal médian.**

L'ANOVA n'indique pas d'effet ni du stimulus conditionnel, ni du groupe expérimental sur l'expression de Zif268 (figure 34-G).

En résumé, après rappel de l'AOPG, la cartographie de l'expression de Zif268 fait apparaître des motifs d'activation cérébrale très différents selon que ce rappel a lieu en présence de l'odeur ou du goût (tableau 15). Il faut noter qu'aucune structure n'est spécifiquement mise en jeu lors de la seule stimulation par le goût. Si le BLA est activé par les deux stimuli, odeur ou goût, cette activation est différentielle et significativement plus marquée chez les Li-O que chez les Li-G. Par contre, le CPa, les noyaux Ce et Med de l'amygdale et les cortex insulaire et orbito-frontal ne sont activés que par l'odeur seule. Ainsi, comme l'expression de Fos, celle de Zif268 nous permet également de constater que les réseaux neuronaux qui sous-tendent le rappel de l'AOPG différent selon la nature du stimulus testé et que l'odeur active un nombre plus important de structures que le goût.

Tableau 15: Structures présentant une modification significative de l'expression de Zif268 lors du rappel de l'AOPG chez les rats jeunes.

Odeur seule	CPa	BLA	Ce	Med	COF	CI
Goût seul		BLA				

Les structures activées en présence de l'odeur mais aussi en présence du goût sont encadrées en bleu.

II.2. Etude de l'activation cérébrale induite par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG chez des rats adultes⁹ (12-13 mois).

II.2.A. Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Fos.

II.2.A.a. Expression de Fos chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base. (Figure 36)

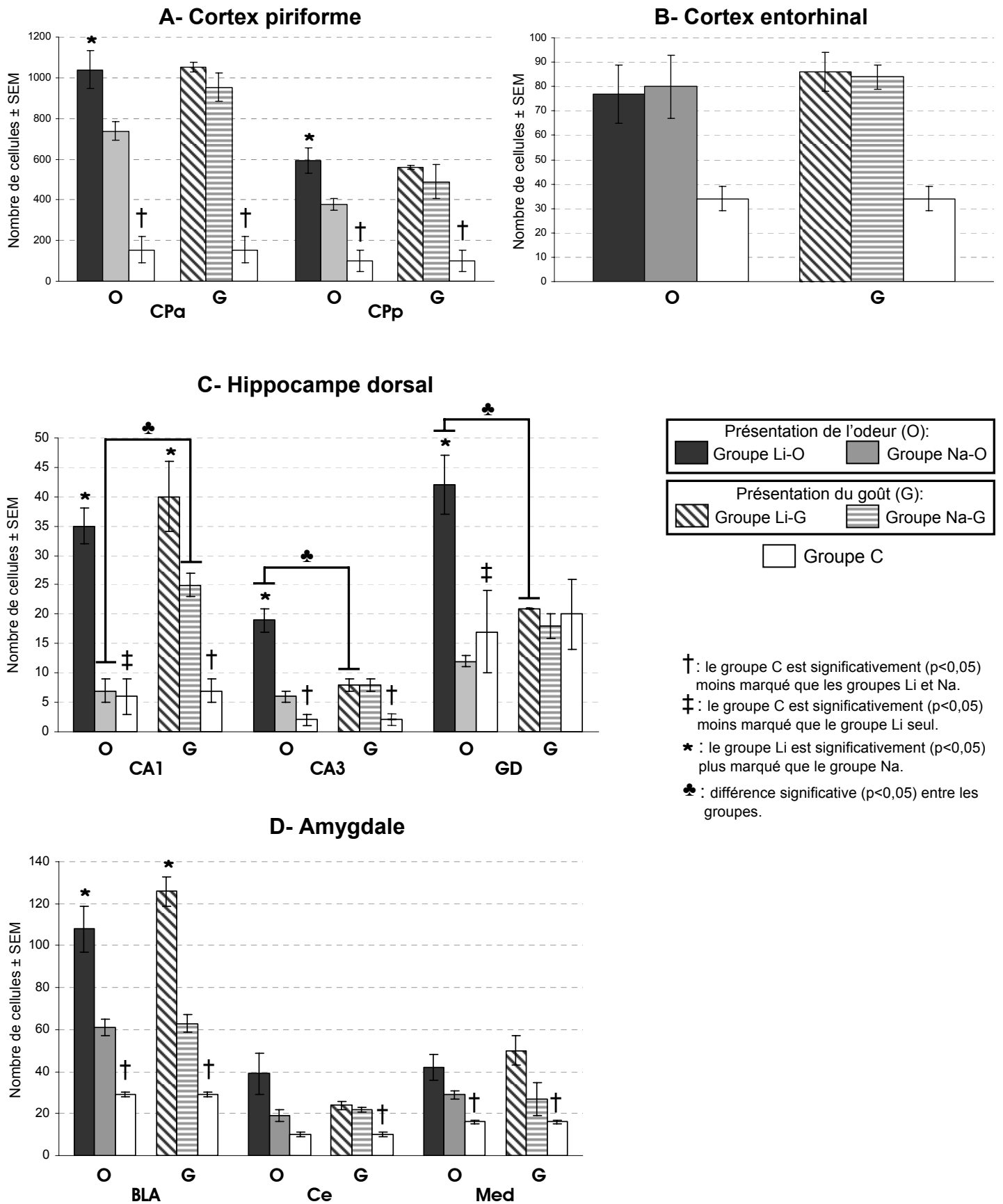
Nous effectuons une ANOVA à un facteur (conditions expérimentales), suivie d'un test de Dunnett, afin d'examiner s'il existe un effet de la manipulation expérimentale sur le nombre de cellules immunoréactives à la protéine Fos chez les rats Li (Li-O ou Li-G) ou Na (Na-O ou Na-G) par rapport aux contrôles de base (C). Afin de clarifier la présentation des résultats, les valeurs statistiques sont regroupées dans le tableau 16.

L'ANOVA à un facteur indique un effet des conditions expérimentales sur l'expression de Fos (tableau 16) sauf dans le cortex entorhinal et le noyau central de l'amygdale lors de la stimulation par l'odeur et dans le gyrus denté de l'hippocampe lors de la stimulation par le goût.

Hormis le GD où seuls les rats Li-O sont significativement plus marqués que les rats C, dans toutes les autres régions, l'expression de Fos chez les animaux Li et Na, qu'ils soient stimulés par l'odeur ou le goût, est plus importante que chez les C.

⁹ Les effectifs des animaux dont les coupes cérébrales ont été analysées sont indiqués ainsi que les analyses statistiques sont présentés dans l'annexe 8.

Figure 36: Expression de Fos chez les rats adultes (12-13 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût



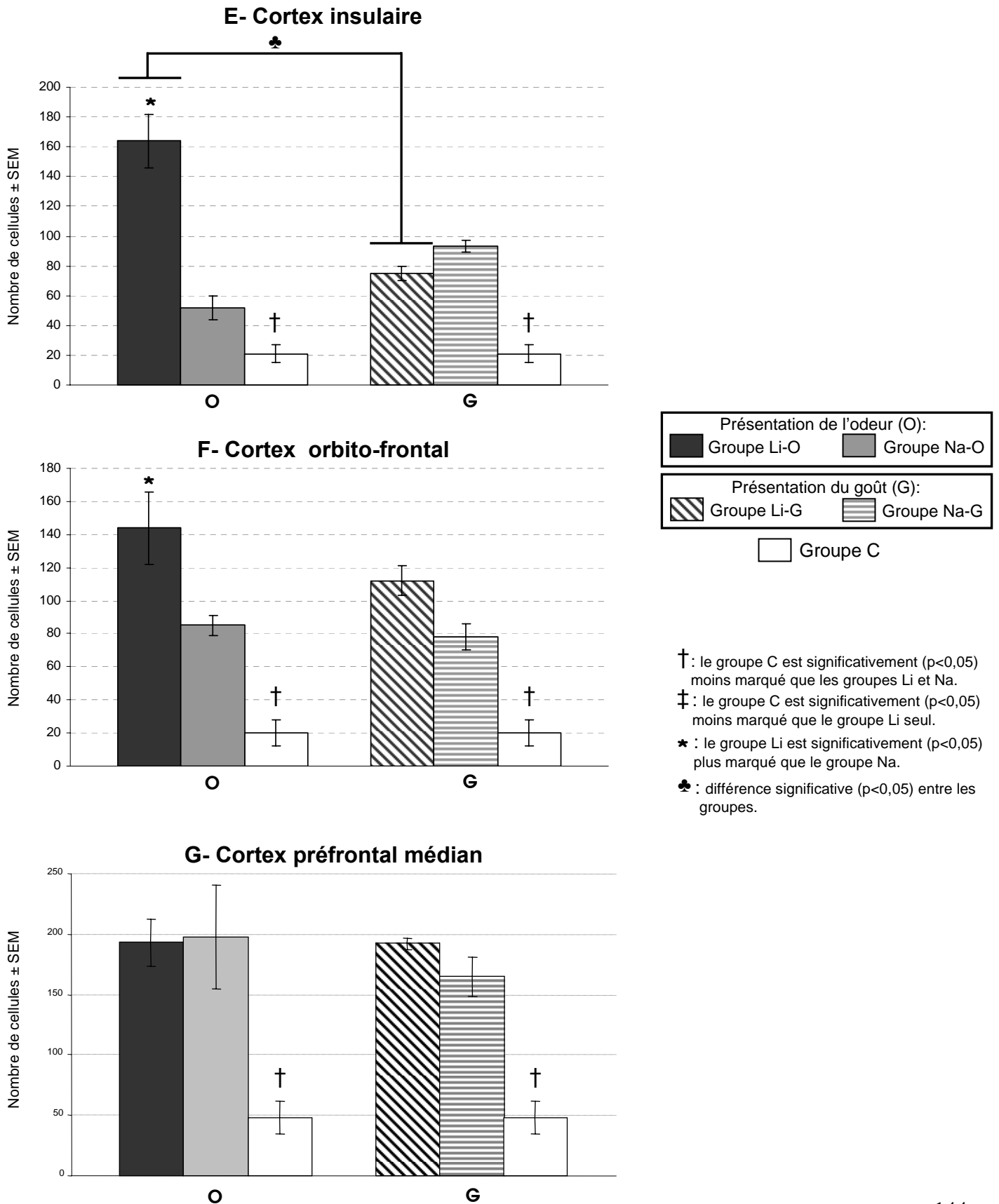
Structures	Rappel en présence de l'odeur	Rappel en présence du goût
CPa	F [2,11]= 26,45 ; p<0,05	F [2,8]= 68,65 ; p<0,05
CPp	F [2,11]= 30,87 ; p<0,05	F [2,8]= 16,58 ; p<0,05
CE	NS	F [2,8]= 20,81 ; p<0,05
CA1	F [2,10]= 44,98 ; p<0,05	F [2,8]= 20,81 ; p<0,05
CA3	F [2,10]= 24,70 ; p<0,05	F [2,8]= 7,58 ; p<0,05
GD	F [2,10]= 16,91 ; p<0,05	NS
BLA	F [2,10]= 19,36 ; p<0,05	F [2,8]= 50,01 ; p<0,05
Ce	NS	F [2,8]= 17,06 ; p<0,05
Med	F [2,8]= 9,06 ; p<0,05	F [2,8]= 6,31 ; p<0,05
CI	F [2,10]= 23,47 ; p<0,05	F [2,8]= 48,46 ; p<0,05
COF	F [2,11]= 10,97 ; p<0,05	F [2,8]= 21,76 ; p<0,05
CPFm	F [2,12]= 3,86 ; p<0,05	F [2,8]= 36,85 ; p<0,05

Tableau 16: Résultats de l'ANOVA à un facteur: effet des conditions expérimentales sur l'expression de Fos lors du rappel de l'AOPG chez les rats adultes. (**NS**: non significatif).

II.1.A.b. Comparaison de l'expression de Fos chez les animaux Li et Na stimulés par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG.

Pour chacune des structures étudiées, nous avons effectué une ANOVA à deux facteurs (l'un étant le stimulus conditionnel présenté le jour du rappel, c'est à dire odeur ou goût; l'autre, le groupe expérimental, c'est-à-dire Li ou Na) suivie d'un test de comparaison de moyennes (Kramer-Tukey).

Figure 36 suite: Expression de Fos chez les rats adultes (12-13 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût.



- **Cortex piriforme.**

Que ce soit dans le cortex piriforme antérieur ou postérieur (figure 36-A), l'ANOVA indique un effet du groupe expérimental (respectivement $F[1,15]=7,52$; $p<0,05$ et $F[1,15]=6,7$; $p<0,05$), aucun effet du stimulus conditionnel, ni d'interaction entre ces facteurs.

Dans les deux subdivisions du CP, l'expression de Fos est significativement ($p<0,05$) plus élevée chez les animaux Li-O comparés aux Na-O. Cependant, nous ne notons pas de différence significative entre les rats Li-G et Na-G.

- **Cortex entorhinal.**

Dans cette structure, nous ne mettons pas en évidence de différence significative de l'expression de Fos quel que soit le stimulus présenté lors du rappel de l'AOPG (figure 36-B).

- **Hippocampe.**

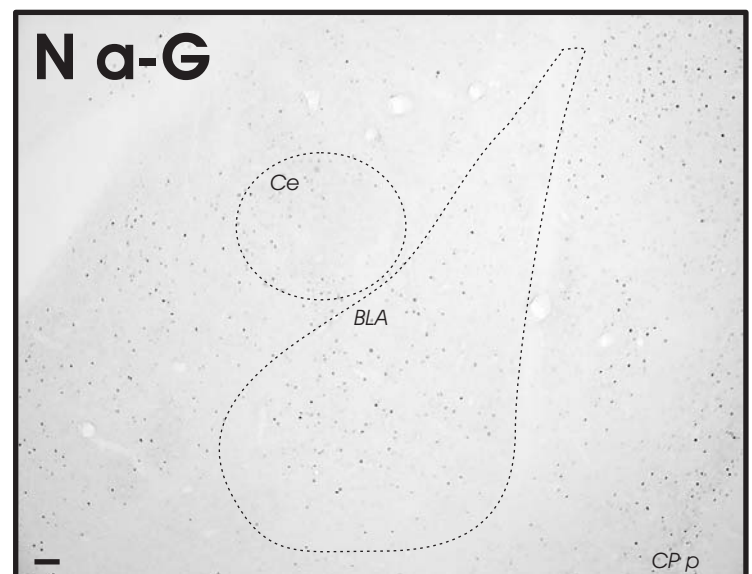
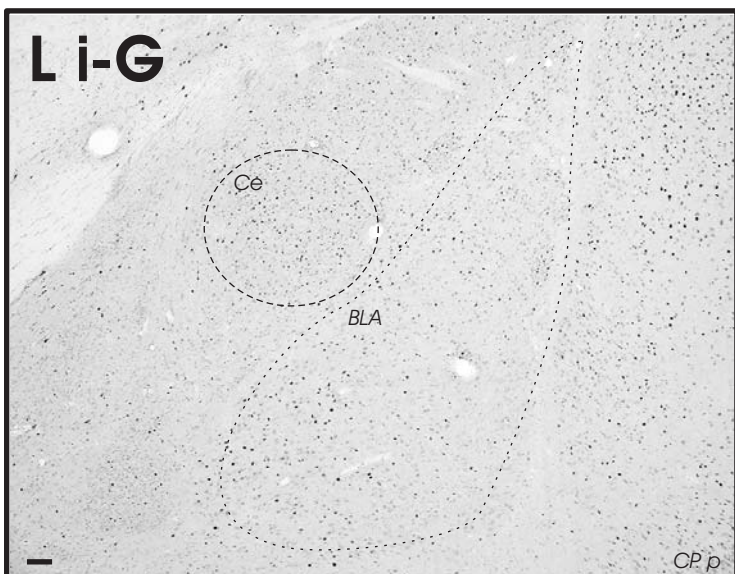
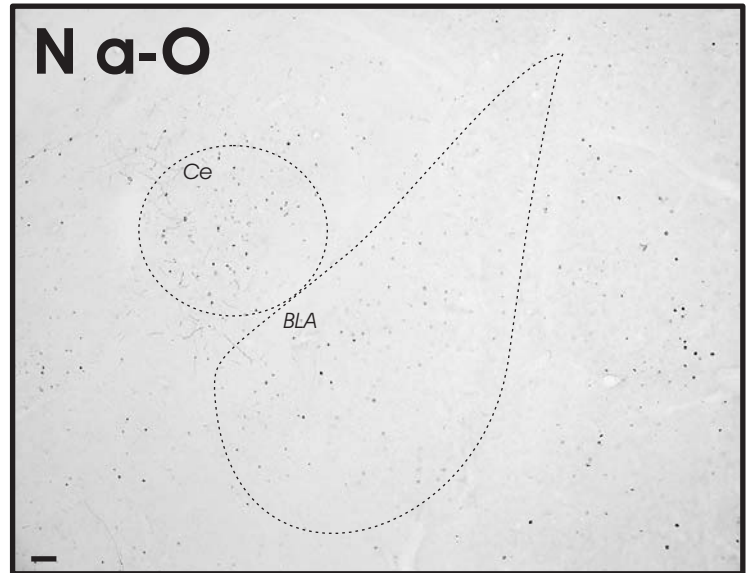
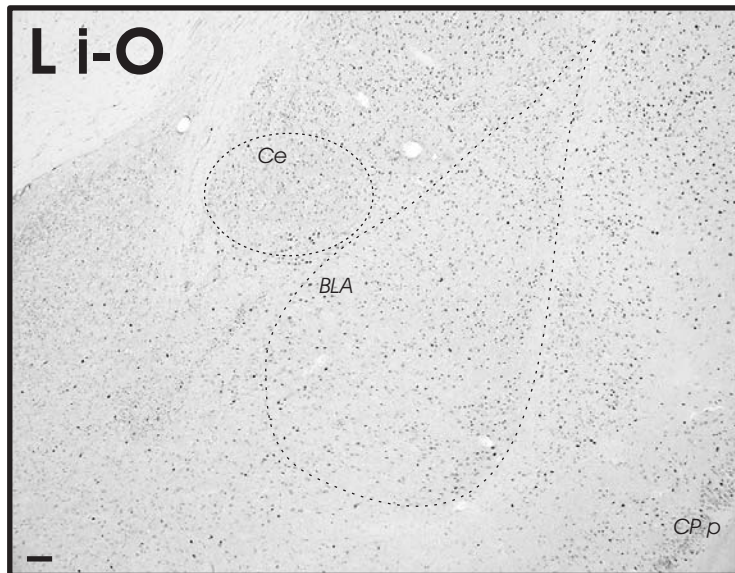
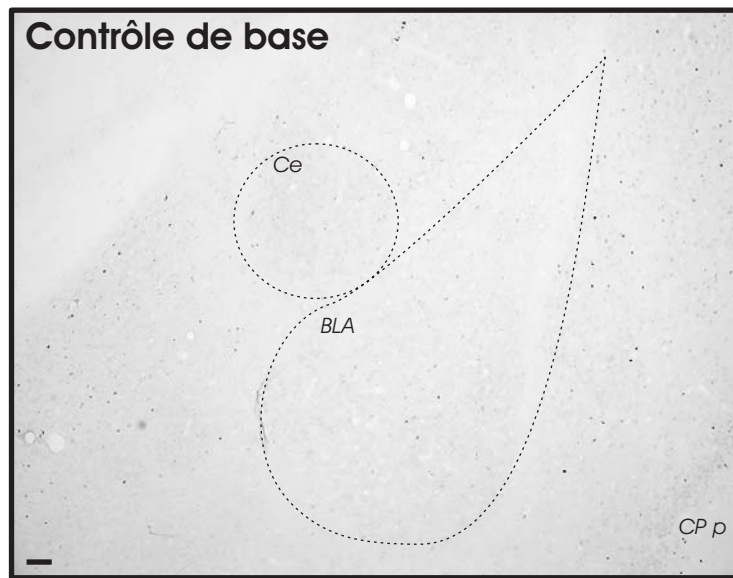
Dans le champ CA1 de l'hippocampe, l'ANOVA indique un effet du stimulus conditionnel ($F[1,14]= 17,09$; $p<0,05$), un effet du groupe expérimental ($F[1,14]= 10,53$; $p<0,05$) mais aucune interaction entre les facteurs considérés. Dans cette région (figure 36-C), le nombre de cellules exprimant Fos est significativement plus important chez les animaux Li que chez les Na que ce soit lors du rappel en présence de l'odeur ou du goût. De plus, l'expression de Fos est significativement plus grande chez les animaux Na-G comparés aux Na-O.

Dans le champ CA3 (figure 36-C), l'ANOVA indique un effet du stimulus conditionnel ($F[1,14]= 5,29$; $p<0,05$), du groupe expérimental ($F[1,14]= 18,11$; $p<0,05$) et une interaction entre ces deux facteurs ($F[1,14]= 14,48$; $p<0,05$). Le nombre de cellules marquées est significativement plus élevé chez les rats Li-O que chez les Na-O. D'autre part, le groupe Li-O est significativement plus marqué que le groupe Li-G.

Enfin, dans le gyrus denté, l'ANOVA indique un effet du stimulus conditionnel ($F[1,14]= 6,36$; $p<0,05$) et du groupe expérimental ($F[1,14]= 21,36$; $p<0,05$) et une interaction entre ces deux facteurs ($F[1,14]= 18,08$; $p<0,05$). Dans cette région, l'immunoréactivité est significativement augmentée chez les rats Li-O comparés aux Na-O

Figure 37: Expression de Fos observée dans l'amygdale chez des rats adultes (12-13 mois) lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût seul.

Microphotographies des noyaux BLA et Ce au grossissement x5, la barre représente 1mm.



(figure 36-C). Nous observons également que l'expression de Fos est significativement plus importante chez les animaux Li-O par rapport aux Li-G.

- **Amygdale.**

Dans le noyau basolatéral (figure 37), l'ANOVA indique un effet du groupe expérimental ($F[1,14]= 38,19$; $p<0,05$), aucun effet du stimulus conditionnel ni d'interaction entre les facteurs étudiés.

La présentation de l'un ou l'autre des stimuli induit une augmentation significative de l'expression de Fos chez les animaux Li-O et Li-G comparés respectivement aux Na-O et Na-G (Figure 36-D).

Soulignons que dans le noyau central, ainsi que dans le noyau médian de l'amygdale, l'ANOVA n'indique aucun effet des facteurs considérés.

- **Cortex insulaire.**

Dans ce cortex, l'ANOVA indique un effet du groupe expérimental $F[1,14]= 11,98$; $p<0,05$) mais pas du stimulus conditionnel. Cette analyse met également en évidence une interaction entre les deux facteurs ($F[1,14]= 22,46$; $p<0,05$).

Le nombre de cellules exprimant Fos est significativement plus grand chez les Li-O que chez les Na-O. De plus, l'expression de Fos chez les rats Li-O est significativement plus importante que chez les Li-G (figure 36-E).

- **Cortex orbito-frontal.**

Dans cette région, l'ANOVA indique uniquement un effet du groupe expérimental $F[1,14]= 8,28$; $p<0,05$) mais elle ne montre ni effet du stimulus conditionnel ni une interaction entre ces facteurs.

Le rappel en présence de l'odeur induit une expression de Fos significativement plus grande chez les rats Li-O comparés aux Na-O (figure 36-F). Par contre, nous ne notons pas de différence entre les groupes expérimentaux lors du rappel en présence du goût.

- **Cortex préfrontal médian.**

Dans cette structure, nous ne mettons pas en évidence de différence significative de l'expression de Fos quel que soit le stimulus présenté lors du rappel de l'AOPG (figure 36-G).

En résumé, chez les rats adultes nous observons, comme chez les jeunes, des motifs différents d'activation selon le stimulus utilisé lors du rappel de l'AOPG (tableau 17). Si le goût seul ne modifie pas l'expression de Fos dans aucune des régions analysées, le noyau basolatéral de l'amygdale et le champ CA1 de l'hippocampe s'activent en présence de l'odeur ou du goût. Par contre, le cortex piriforme, les régions CA3 et GD de l'hippocampe, les cortex insulaire et cortex orbito-frontal ne réagissent qu'en présence de l'odeur seule. Ainsi se dessinent des réseaux différents d'activation en fonction du stimulus utilisé pour le rappel et l'odeur induit une expression de Fos dans un nombre de structures plus important que le goût.

Tableau 17: Structures présentant une modification significative de l'expression de Fos lors du rappel de l'AOPG chez les rats adultes.

Odeur seule	CPa	CPp	BLA	CA1	CA3	GD	COF	CI
Goût seul			BLA	CA1				

Les structures activées en présence de l'odeur mais aussi en présence du goût sont encadrées en bleu.

II.2.B. Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Zif268¹⁰.

II.2.B.a. Expression de Zif268 chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base. (Figure 38)

Nous effectuons une ANOVA à un facteur (la condition expérimentale), suivie d'un test de Dunnett, afin d'examiner s'il existe un effet de la manipulation expérimentale sur le nombre de cellules immunoréactives à la protéine Zif268 chez les rats Li (Li-O ou Li-G) ou Na (Na-O ou Na-G) par rapport aux contrôles de base (C).

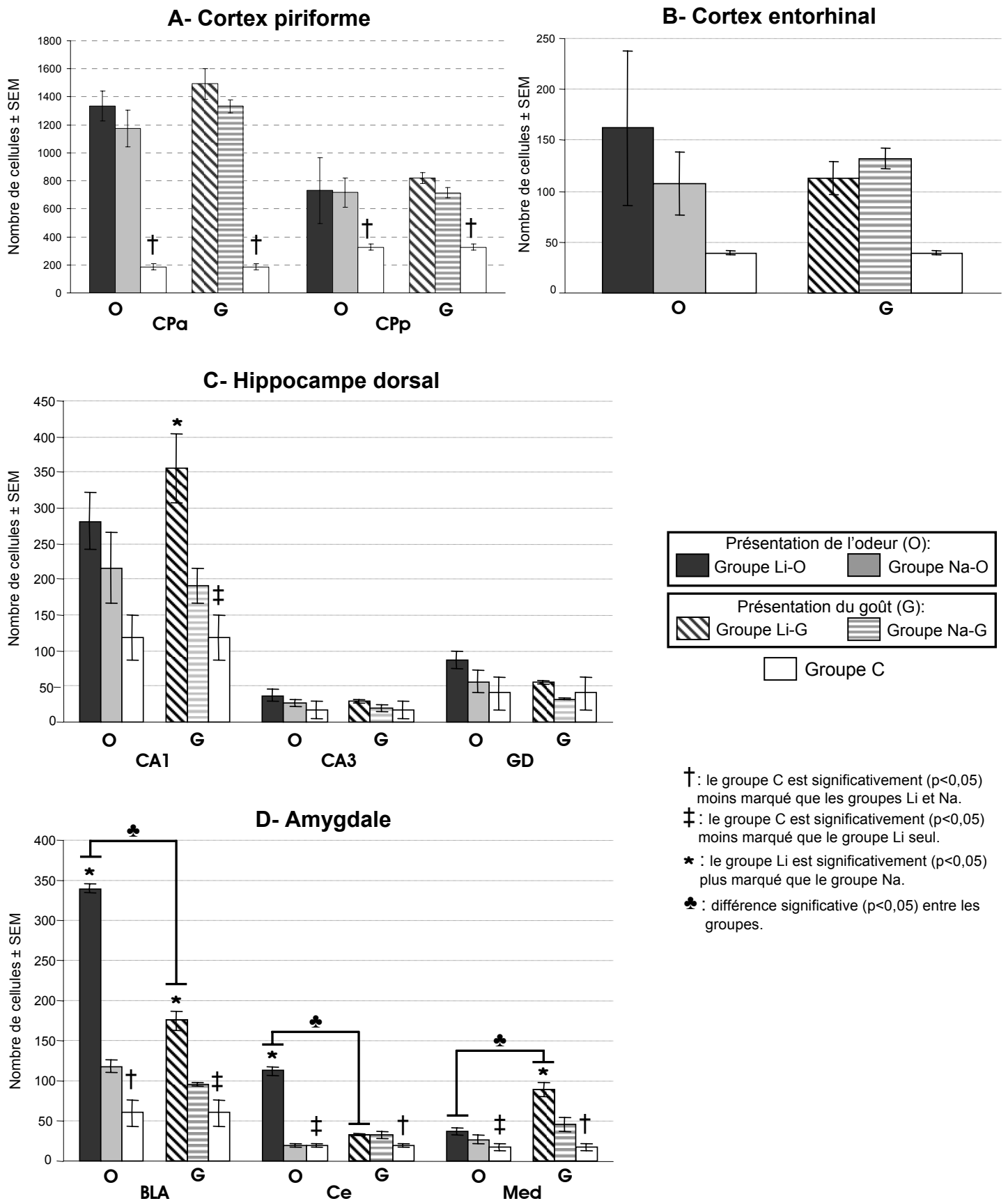
L'ANOVA à un facteur indique un effet des conditions expérimentales sur l'expression de Zif268 (tableau 18) dans la majorité des régions étudiées, à l'exception du cortex entorhinal et de l'hippocampe (CA1, CA3 et GD) lors de la stimulation par l'odeur et dans le cortex entorhinal et les régions CA3 et gyrus denté de l'hippocampe lors de la stimulation par le goût.

Les groupes Li-O et Na-O sont significativement plus marqués que le groupe C dans le CP, le BLA, le COF et le CPFm. Par contre, dans les noyaux Ce et Med de l'amygdale, ainsi que dans le CI, seuls les animaux Li-O sont significativement plus marqués que les C.

Les groupes Li-G et Na-G sont significativement plus marqués que le groupe C dans le CP, les noyaux Ce et Med de l'amygdale, le CI, le COF et le CPFm. Cependant, dans le BLA et le CA1 de l'hippocampe seuls les rats Li-G sont significativement plus marqués que les C.

¹⁰ Les effectifs des animaux pris en compte pour chacune des structures étudiées et les analyses statistiques sont rassemblés dans l'annexe 9.

Figure 38: Expression de Zif268 chez les rats adultes (12-13 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût.



Structures	Rappel en présence de l'odeur	Rappel en présence du goût
CPa	F [2,11]= 22,7 ; p<0,05	F [2,8]= 39,3 ; p<0,05
CPp	F [2,11]= 9,95 ; p<0,05	F [2,8]= 43,99 ; p<0,05
CE	NS	NS
CA1	NS	F [2,8]= 11,87 ; p<0,05
CA3	NS	NS
GD	NS	NS
BLA	F [2,7]= 245,15 ; p<0,05	F [2,8]= 14,97 ; p<0,05
Ce	F [2,8]= 173,72 ; p<0,05	F [2,8]= 6,42 ; p<0,05
Med	F [2,8]= 4,57 ; p<0,05	F [2,8]= 34,52 ; p<0,05
CI	F [2,10]= 10,24 ; p<0,05	F [2,8]= 47,8 ; p<0,05
COF	F [2,11]= 8,73 ; p<0,05	F [2,8]= 7,92 ; p<0,05
CPFm	F [2,12]= 10,24 ; p<0,05	F [2,8]= 47,58 ; p<0,05

Tableau 18: Résultats de l'ANOVA à un facteur: effet des conditions expérimentales sur l'expression de Zif268 lors du rappel de l'AOPG chez les rats adultes. (NS: non significatif).

II.2.B.b. Comparaison de l'expression de Zif268 chez les animaux Li et Na stimulés par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG.

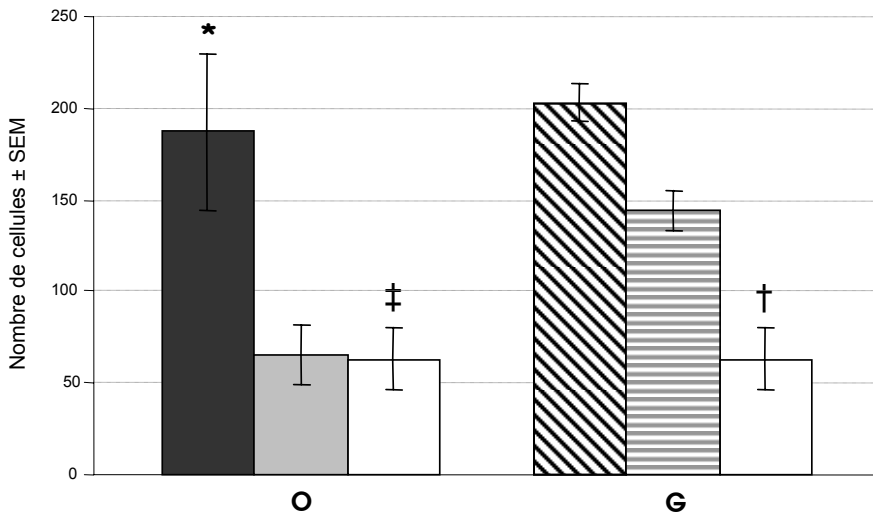
Pour chacune des structures étudiées, nous avons effectué une ANOVA à deux facteurs (l'un étant le stimulus conditionnel présenté le jour du rappel, c'est à dire odeur ou goût; l'autre étant le groupe expérimental, c'est-à-dire Li ou Na) suivie d'un test de comparaison de moyennes (Kramer-Tukey).

- **Cortex piriforme.**

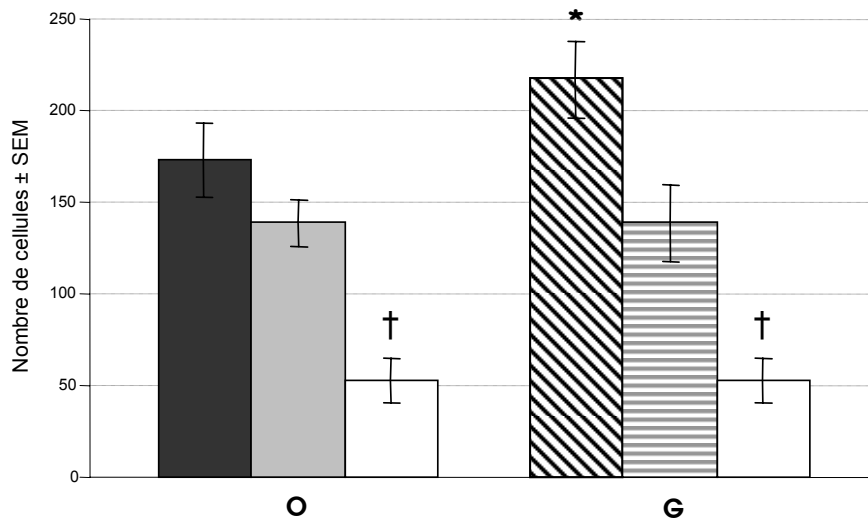
Que ce soit dans les subdivisions antérieure ou postérieure du cortex piriforme, l'ANOVA n'indique pas d'effet du groupe expérimental ni du stimulus conditionnel sur l'expression de Zif268 (figure 38-A).

Figure 38 suite: Expression de Zif268 chez les rats adultes (12-13 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût.

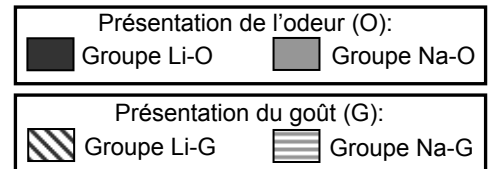
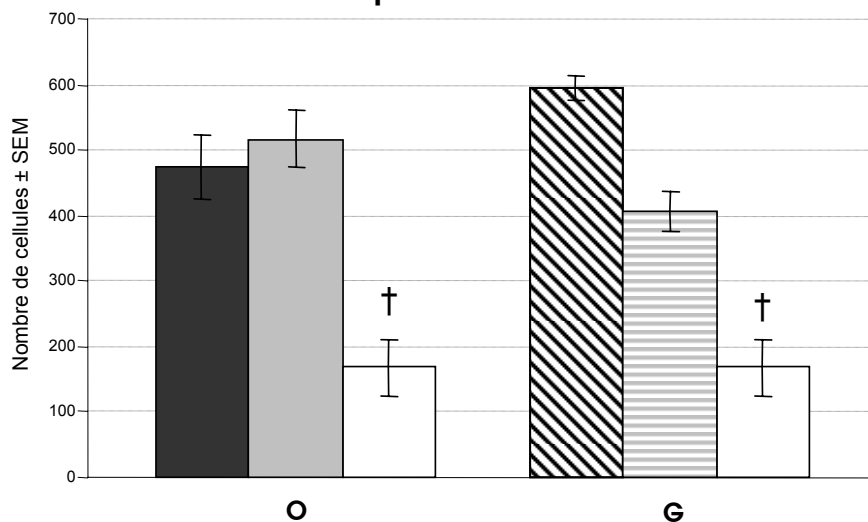
E- Cortex insulaire



F- Cortex orbito-frontal



G- Cortex préfrontal médian



Groupe C

- † : le groupe C est significativement ($p < 0,05$) moins marqué que les groupes Li et Na.
- ‡ : le groupe C est significativement ($p < 0,05$) moins marqué que le groupe Li seul.
- * : le groupe Li est significativement ($p < 0,05$) plus marqué que le groupe Na.
- ♣ : différence significative ($p < 0,05$) entre les groupes.

- **Cortex entorhinal.**

Dans cette région, l'ANOVA n'indique ni d'effet du groupe expérimental ni du stimulus conditionnel sur l'expression de Zif268. Nous ne notons pas de différence significative entre les groupes Li-O, Na-O, Li-G et Na-G (figure 38-B).

- **Hippocampe.**

Dans le champ CA1, l'ANOVA indique un effet du groupe expérimental ($F[1,14]=5,91$; $p<0,05$) mais aucun effet du stimulus conditionnel, ni d'interaction entre ces facteurs. Nous observons que les rats Li-G présentent un nombre de cellules marquées significativement supérieur à celui du groupe Na-G (Figure 38-C).

Dans les régions CA3 et GD, l'ANOVA n'indique pas d'effet du groupe expérimental ni du stimulus conditionnel ni d'interaction entre ces facteurs.

- **Amygdale.**

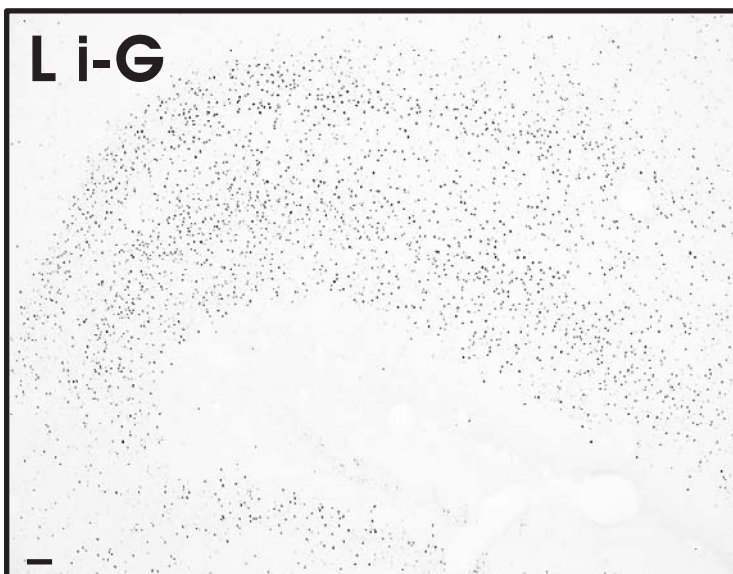
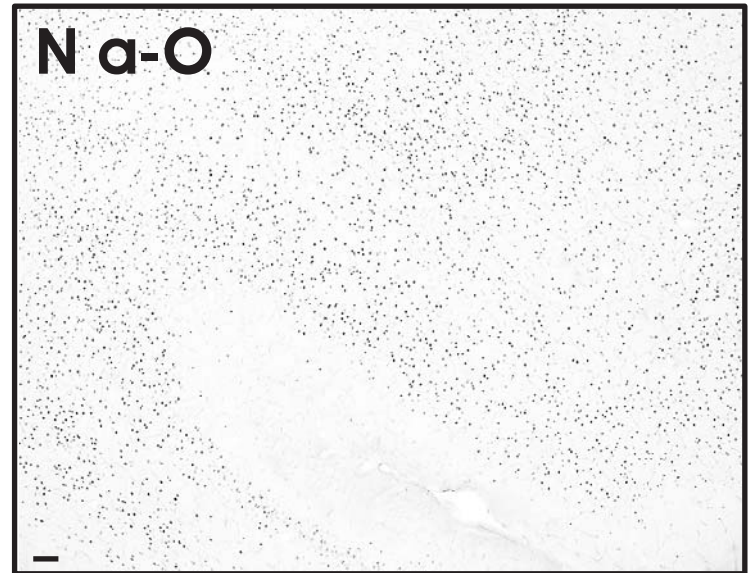
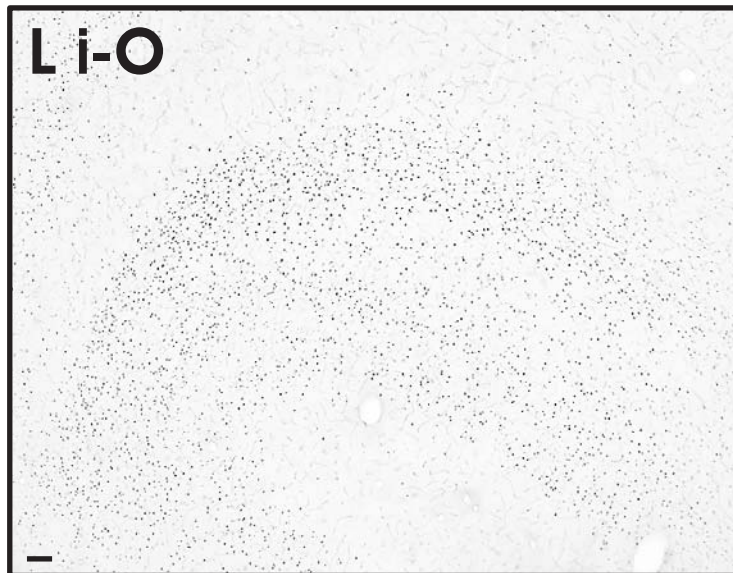
Dans le noyau basolatéral, l'ANOVA indique un effet du groupe expérimental ($F[1,11]=178,22$; $p<0,05$), un effet du stimulus conditionnel ($F[1,11]=75,65$; $p<0,05$), et une interaction entre ces facteurs ($F[1,11]=43,96$; $p<0,05$), sur l'expression de Zif268. Le nombre de cellules marquées est significativement plus important chez le groupe Li-O que chez les Na-O (figure 38-D). De même, les rats Li-G sont significativement plus marqués que les Na-G. Enfin, l'expression de Zif268 est significativement plus importante chez les rats Li-O par rapport aux Li-G.

Dans le noyau central, l'ANOVA indique, sur l'expression de Zif268, un effet du groupe expérimental ($F[1,12]=142,52$; $p<0,05$) et du stimulus conditionnel ($F[1,12]=69,71$; $p<0,05$) ainsi qu'une interaction entre ces facteurs ($F[1,12]=130,74$; $p<0,05$). Le nombre de cellules exprimant ce marqueur chez les animaux Li-O est significativement plus grand que chez les Na-O. D'autre part, le groupe Li-O est significativement plus marqué que le groupe Li-G (figure 38-D).

Dans le noyau médian, l'analyse statistique indique un effet du groupe expérimental ($F[1,11]=22,53$; $p<0,05$), du stimulus conditionnel ($F[1,11]=34,52$; $p<0,05$) et une interaction entre les facteurs ($F[1,11]=9,19$; $p<0,05$) sur l'expression de Zif268. Le nombre

Figure 39: expression Zif268 observée dans le cortex orbito-frontal chez des rats adultes (12-13 mois) lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût seul.

Microphotographies du cortex orbito-frontal au grossissement x5, la barre représente 1mm.



de cellules marquées est significativement supérieur chez les rats Li-G par rapport aux Na-G (figure 38-D). De plus, l'expression de Zif268 est significativement plus importante chez les rats Li-G que chez les Li-O.

- **Cortex insulaire**

L'ANOVA indique seulement un effet du groupe expérimental ($F[1,14]= 11,49$; $p<0,05$) mais pas du stimulus conditionnel sur l'expression de Zif268. L'immunoréactivité est significativement plus importante uniquement chez les rats Li-O que chez les rats Na-O (figure 38-E).

- **Cortex orbito-frontal.**

Dans ce cortex (figure 39), l'ANOVA indique un effet du groupe expérimental ($F[1,15]= 7,82$; $p<0,05$) mais pas du stimulus conditionnel sur l'expression de Zif268. Nous observons que seul le marquage des rats Li-G est significativement plus important que celui des Na-G (figure 38-F).

- **Cortex préfrontal médian.**

Dans cette région, l'ANOVA n'indique d'effet ni du groupe expérimental ni du stimulus conditionnel sur l'expression de Zif268. Nous ne notons pas de différence significative entre les groupes Li-O, Na-O, Li-G et Na-G (figure 38-G).

En résumé, nous observons que l'expression de Zif268 (tableau 19) est significativement modifiée chez les rats Li par rapport aux rats Na en présence soit de l'odeur, soit du goût, dans le noyau basolatéral de l'amygdale seulement, de plus, nous remarquons une activation différentielle, l'odeur induisant un marquage plus important que le goût. D'autre part, nous mettons en évidence que l'activation de certaines régions cérébrales est spécifique de l'un ou l'autre des stimuli. En effet, la présentation de l'odeur seule active le Ce et le CI alors que le goût seul, lui, active le champ CA1 de l'hippocampe, le Med et le cortex orbito-frontal. L'expression de Zif268 permet donc de distinguer entre des réseaux activés par l'un ou l'autre des deux stimuli utilisés pour induire le rappel de l'AOPG.

Tableau 19: Structures présentant une modification significative de l'expression de Zif268 lors du rappel de l'AOPG chez les rats adultes.

Odeur seule	BLA	Ce			CI
Goût seul	BLA		Med	CA1	COF

Les structures activées en présence de l'odeur mais aussi en présence du goût sont encadrées en bleu.

II.3. Etude de l'activation cérébrale induite par l'odeur lors du rappel de l'AOPG chez les rats sénescents¹¹ (20-24 mois).

Suite à des problèmes de cryoprotection et/ou cryostat, les cerveaux des animaux soumis au rappel de l'AOPG en présence du goût ne sont pas exploitables pour l'immunohistochimie. Dans cette dernière partie des résultats nous ne présenterons donc que la cartographie de Fos et Zif268 lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur seule.

Pour cette raison, nous avons analysé les différences d'expression de Fos ou de Zif268 entre les groupes Li-O, Na-O et C par une ANOVA à une voie avec comme facteur le groupe expérimental (Li-O, Na-O et C).

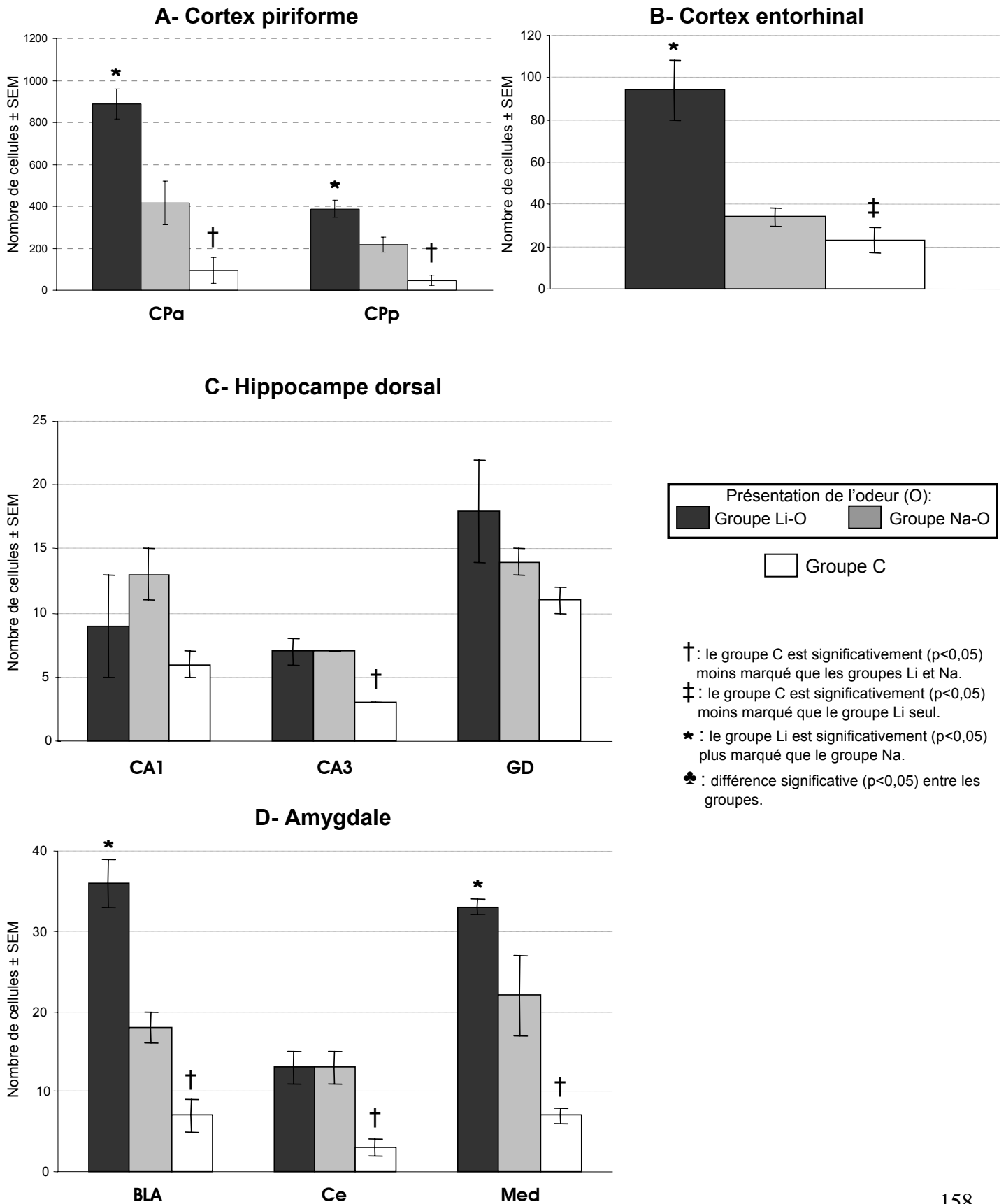
II.3.A. Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Fos.

II.3.A.a. Expression de Fos chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base. (Figure 40)

L'ANOVA, signale un effet du groupe expérimental sur l'expression de Fos dans toutes les structures étudiées sauf dans CA1 et le GD. Les valeurs de F de cette analyse sont indiquées dans le tableau 20. L'expression de Fos chez les animaux Li-O et Na-O est significativement plus forte que chez les C, à l'exception du CE et du CPFm où seul le groupe Li-O est plus marqué que le groupe C.

¹¹ Les effectifs des animaux analysés pour chacune des structures sont indiqués dans l'annexe 10.

Figure 40: Expression de Fos chez les rats sénescents (20-24 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur.



Structures	Rappel en présence de l'odeur
CPa	F [2,12]= 22,3 ; p<0,05
CPp	F [2,12]= 20,03 ; p<0,05
CE	F [2,11]= 12,03 ; p<0,05
CA1	NS
CA3	F [2,9]= 11,37 ; p<0,05
GD	NS
BLA	F [2,10]= 38,95 ; p<0,05
Ce	F [2,11]= 11,16 ; p<0,05
Med	F [2,11]= 13,26 ; p<0,05
CI	F [2,12]= 4,07 ; p<0,05
COF	F [2,12]= 13,9 ; p<0,05
CPFm	F [2,10]= 9,33 ; p<0,05

Tableau 20: Résultats de l'ANOVA à un facteur: effet du groupe expérimental sur l'expression de Fos lors du rappel de l'AOPG chez les rats sénescents. (NS: non significatif).

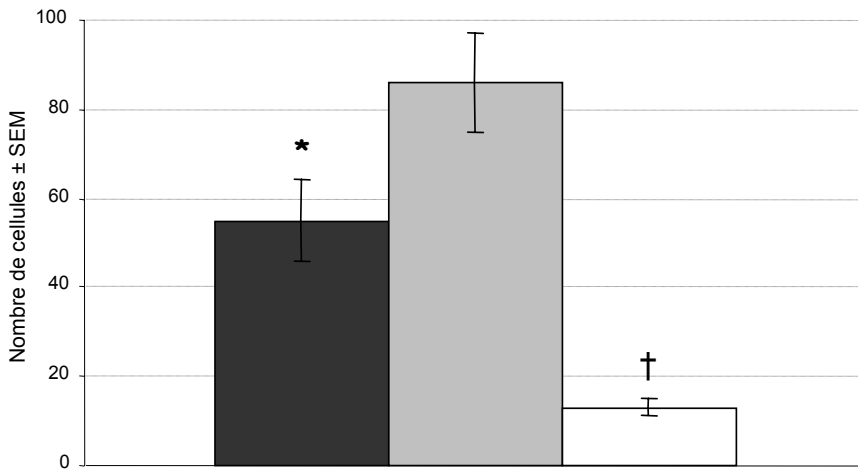
II.3.A.b. Comparaison de l'expression de Fos chez les animaux Li et Na stimulés par l'odeur lors du rappel de l'AOPG.

Dans le CPa, le CPp, le CE, le BLA, le Med et le CPFm (Figure 40 et 41), les animaux Li-O sont significativement ($p<0,05$) plus marqués que les Na-O. Au contraire, dans le CI, la comparaison de ces deux groupes montre que l'expression de Fos est plus faible chez les Li-O que chez les Na-O.

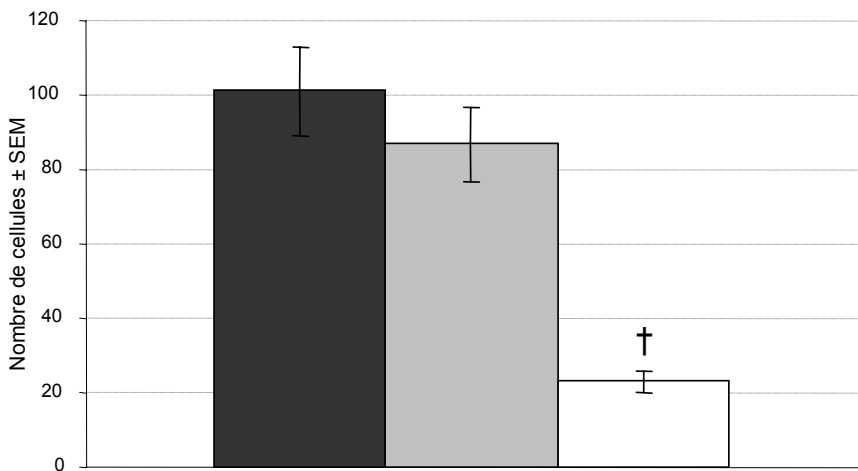
En résumé, nous observons que le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur chez les animaux les plus âgés entraîne une augmentation significative de l'expression de Fos que dans cinq des sept structures considérées.

Figure 40 suite: Expression de Fos chez les rats sénescents (20-24 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur.

E- Cortex insulaire



F- Cortex orbito-frontal



Présentation de l'odeur (O):

■ Groupe Li-O	■ Groupe Na-O
---------------	---------------

□ Groupe C

- † : le groupe C est significativement ($p < 0,05$) moins marqué que les groupes Li et Na.
- ‡ : le groupe C est significativement ($p < 0,05$) moins marqué que le groupe Li seul.
- * : le groupe Li est significativement ($p < 0,05$) plus marqué que le groupe Na.
- ♣ : différence significative ($p < 0,05$) entre les groupes.

G- Cortex préfrontal médian

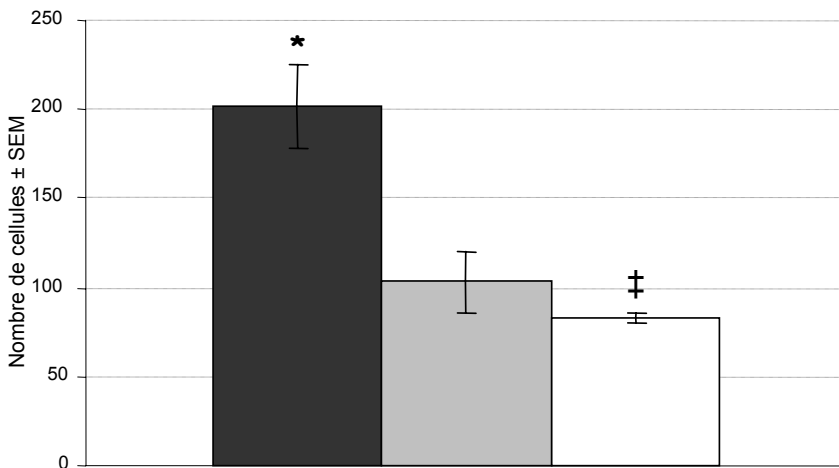
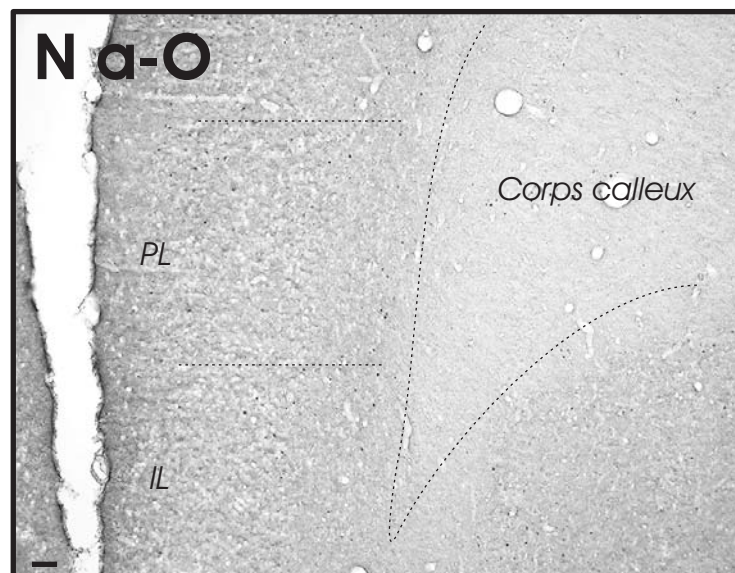
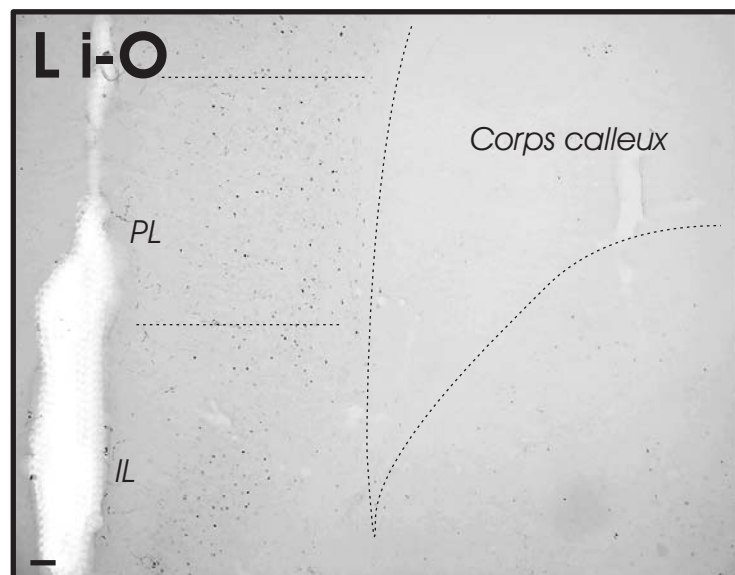
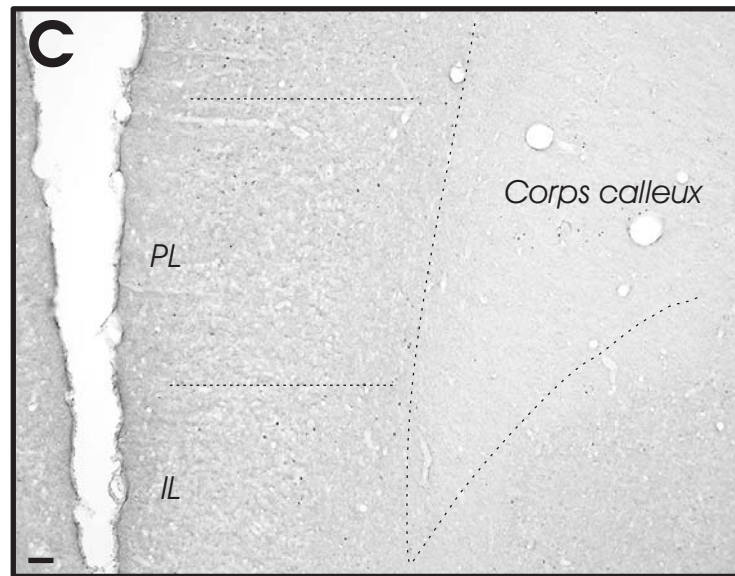


Figure 41: Expression de marquage Fos observée dans le cortex préfrontal médian chez des rats sénescents (20-24 mois) lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût seul.

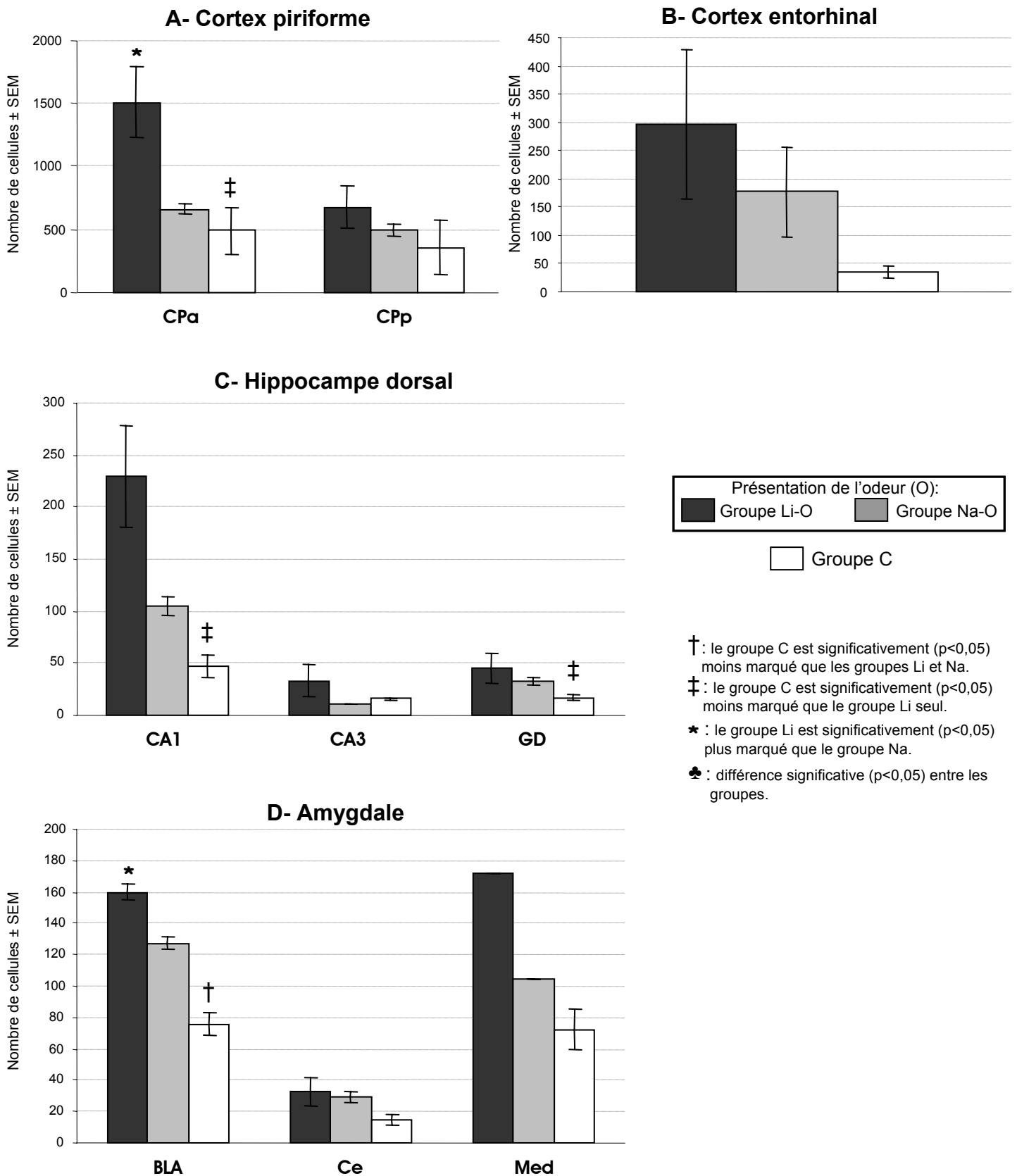
Microphotographies du cortex préfrontal médian au grossissement x5, la barre représente 1mm.



PL: cortex prélimbique

IL: Cortex infralimbique

Figure 42: Expression de Zif268 chez les rats sénescents (20-24 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur.



II.3.B. Cartographie par détection immunocytochimique de la protéine Zif268¹².

II.3.A.a. Expression de Zif268 chez les rats Li et Na par rapport aux rats contrôles de base. (Figure 42)

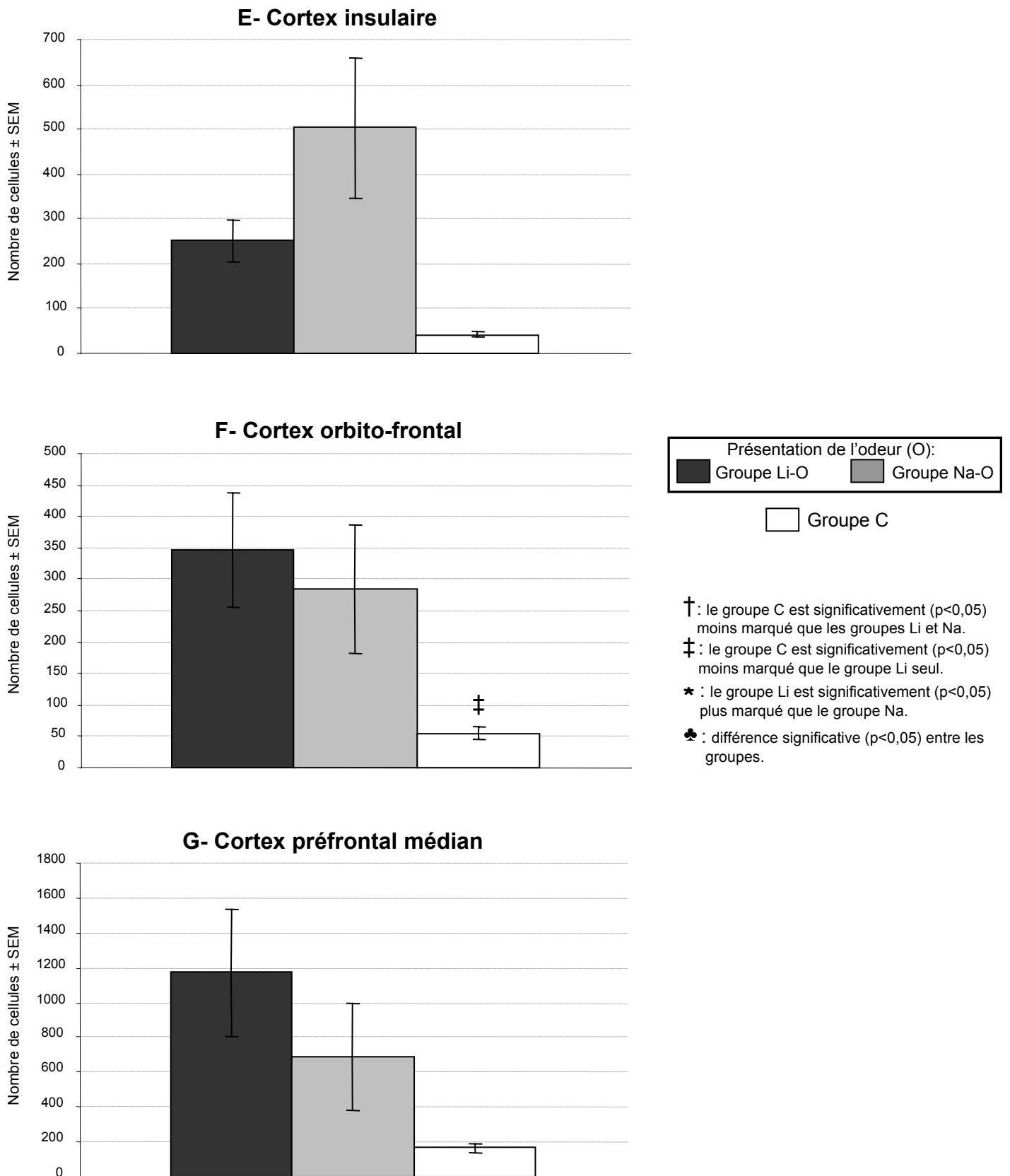
L'ANOVA signale un effet du groupe expérimental sur l'expression de Zif268 uniquement dans le CPa, le champ CA1 et le GD de l'hippocampe, le BLA et le COF (tableau 21). Dans ces structures, sauf le BLA, seuls les animaux Li-O sont significativement ($p < 0,05$) plus marqués que les C. Dans le BLA, l'expression de Zif268 chez les Li-O et les Na-O est significativement supérieure ($p < 0,05$) à celle du groupe C.

Structures	Rappel en présence de l'odeur
CPa	F [2,10]= 5,28 ; $p < 0,05$
CPp	NS
CE	NS
CA1	F [2 ,5]= 9,17 ; $p < 0,05$
CA3	NS
GD	F [2,5]= 5,61 ; $p < 0,05$
BLA	F [2,6]= 58,82 ; $p < 0,05$
Ce	NS
Med	NS
CI	NS
COF	F [2,10]= 3,66 ; $p < 0,05$
CPFm	NS

Tableau 21: Résultats de l'ANOVA à un facteur: effet du groupe expérimental sur l'expression de Fos lors du rappel de l'AOPG chez les rats sénescents. (NS: non significatif).

¹² Les effectifs des animaux analysés pour chacune des structures, ainsi que les analyses statistiques sont indiqués dans l'annexe 10.

Figure 42 suite: Expression de Zif268 chez les rats sénescents (20-24 mois) après le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur.



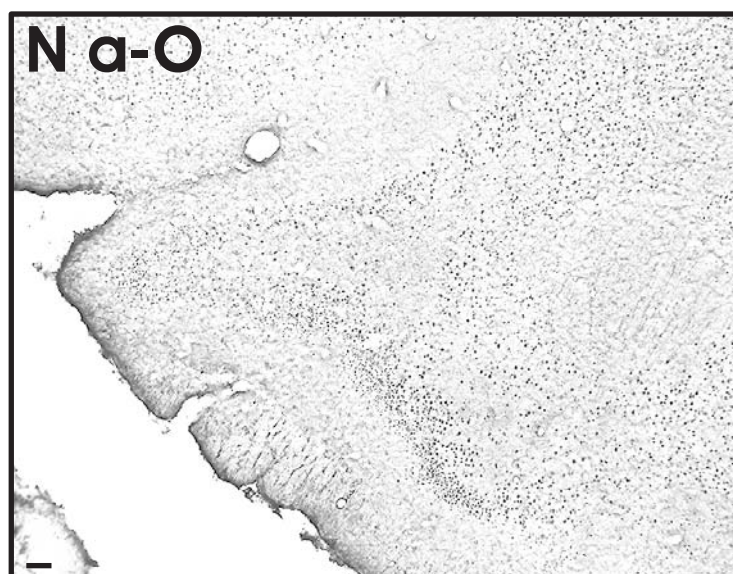
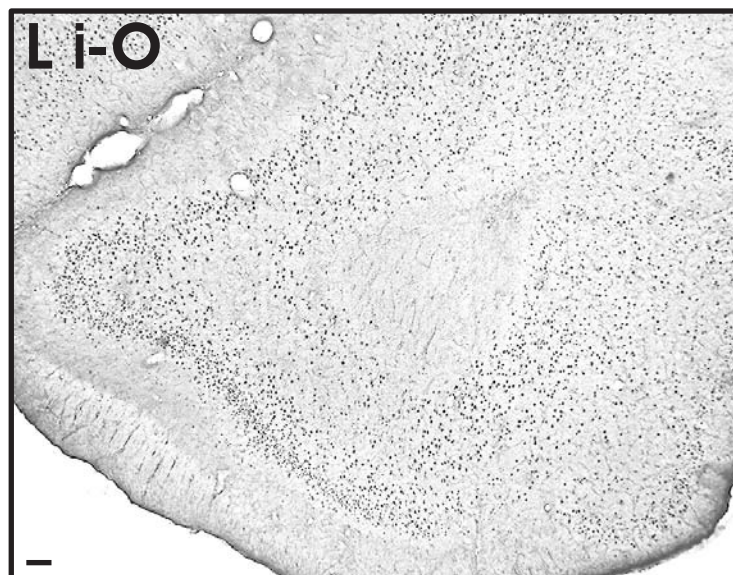
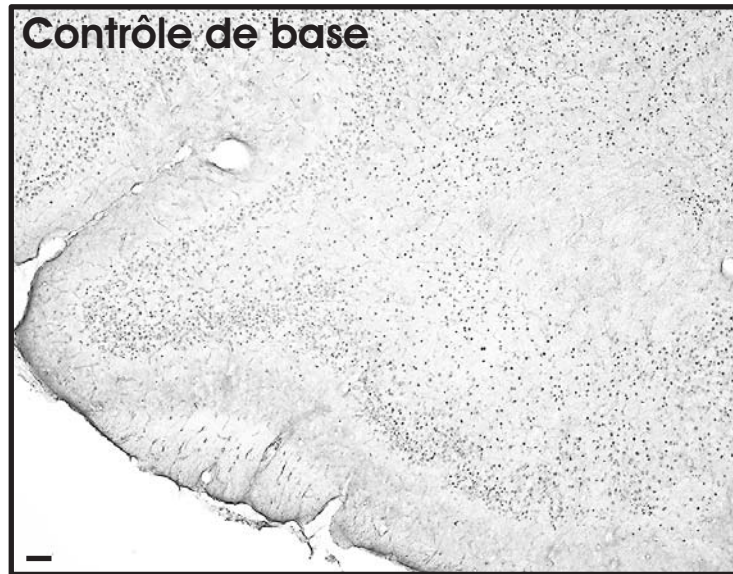
II.3.B.b. Comparaison de l'expression de Zif268 chez les animaux Li et Na stimulés par l'odeur lors du rappel de l'AOPG.

Nous observons que les animaux Li-O sont significativement ($p < 0,05$) plus marqués que les Na-O seulement dans le CPa (Figure 42-A et 43) et le BLA (figure 42-D). Dans toutes les autres régions étudiées, l'expression de Zif268 n'est pas différente entre les groupes Li-O et Na-O (Figure 42).

En résumé, chez les animaux sénescents, nous ne notons que deux régions, le CP et le BLA, montrant une différence d'expression de Zif268 suite au rappel de l'AOPG en présence de l'odeur seule.

Figure 43: Expression de Zif268 observée dans le cortex piriforme antérieur chez des rats sénescents (20-24 mois) lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût seul.

Microphotographies du cortex piriforme antérieur au grossissement x5, la barre représente



**III. Effet de l'âge sur
l'expression de Fos et de Zif268
lors du rappel de l'AOPG.**

Après avoir examiné l'effet du rappel de l'AOPG sur l'expression de Fos et Zif268 pour chacun des trois âges considérés, nous allons comparer les patterns d'activation en fonction de l'âge.

Pour ce faire, nous analysons les variations de Fos et Zif268 chez les rats contrôles de base en fonction de l'âge, ainsi que l'amplitude de la différence d'expression de ces deux marqueurs entre les rats Li et Na.

III.1. Evolution de l'expression de Fos et Zif268 chez les rats contrôles de base en fonction de l'âge.

Nous avons voulu déterminer si l'âge avait, ou non, un impact sur l'expression de Fos et de Zif268 dans les conditions de base en effectuant une ANOVA avec l'âge pour facteur (tableau 22).

Nous ne notons pas d'influence de l'âge sur l'expression basale de Fos dans le CPa, le CE, le CA1 et CA3, le CI et le COF. Toutefois, dans les noyaux amygdaliens et le CPFm, l'expression de Fos est significativement ($p < 0,05$) plus forte chez les jeunes rats et les adultes que chez les sénescents. Dans le CPp, l'expression basale chez les jeunes est significativement plus élevée que chez les sénescents; c'est l'inverse dans le gyrus denté de l'hippocampe.

Nous n'observons pas d'influence de l'âge sur l'expression de Zif268 dans le CPp, le CE, le CA3, le GD, le BLA, le Ce, le CI, le COF et le CPFm. Dans le CPa, l'expression basale est significativement plus élevée chez les jeunes et les sénescents que chez les adultes. Dans le champ CA1 de l'hippocampe nous observons l'inverse. Dans le Med, le marquage basal prédomine ($p < 0,05$) chez les sénescents par rapport aux jeunes rats.

	Expression de Fos		Expression de Zif268	
CPa	NS		F[2,6]= 9,32 ; p<0,05	J & S > A
CPp	F[2,7]= 5,69 ; p<0,05	J > S	NS	
CE	NS		NS	
CA1	NS		F[2,5]= 7,32 ; p<0,05	A > J & S
CA3	NS		NS	
GD	F[2,6]= 5,65 ; p<0,05	S > J	NS	
BLA	F[2,7]= 11,98 ; p<0,05	J & A > S	NS	
Ce	F[2,7]= 12,45 ; p<0,05	J & A > S	NS	
Med	F[2,7]= 19,96 ; p<0,05	J & A > S	F[2,6]= 14,51 ; p<0,05	S > J
CI	NS		NS	
COF	NS		NS	
CPFm	F[2,6]= 7,37 ; p<0,05	J & A > S	NS	

Tableau 22 : Différences d'expression de Fos et Zif268 chez les animaux C au cours du vieillissement. (Significativités d'une ANOVA avec l'âge pour facteur, J: rats jeunes, A: rats adultes et S: rats sénescents ; le symbole : > indique, pour les structures où les différences sont significatives (p<0,05), les groupes de rats les plus marqués par rapport à ceux dont le marquage est plus faible).

III.2. Evolution en fonction de l'âge de la différence d'expression de Fos et Zif268 entre les groupes Li et Na.

Pour mettre en évidence l'effet du vieillissement sur l'évolution des marquages Fos et Zif268, nous avons calculé le pourcentage de variation du nombre de cellules marquées entre les groupes Li et Na pour chacune des structures où une différence significative apparaît entre ces deux groupes, par la formule suivante:

$$[(n \text{ Li} - n \text{ Na}) / (n \text{ Li})] \times 100$$

avec « **n Li** » le nombre de cellules marquées chez les rats Li et « **n Na** » celui chez les rats Na.

A - Expression de la protéine Fos

Odeur	CP a	CP p	BLA	Med	CE	CA1	CA3	DG	COF	CPFm	CI
Jeunes	37	39	34		52	46	59		40	40	47
Adultes	29	37	44			80	68	71	41		68
Sénes- cents	33	44	50	33	64					49	-56

Goût	BLA	CA1	CA3	COF	CPFm
Jeunes	26	58	56	31	49
Adultes	50	38			

B - Expression de la protéine Zif268


Odeur	CP a	CP p	BLA	Ce	Med	COF	CI
Jeunes	34	19	54	48	49	34	35
Adultes			65	83			65
Sénes- cents	56		20				

Goût	BLA	Med	CA1	COF
Jeunes	33			
Adultes	46	45	46	36

Tableau 23: Variations, exprimées en pourcentage, de l'expression de Fos et Zif268 entre les rats Li et Na pour les trois groupes d'âge considérés.

Les pourcentages sont indiqués seulement lorsque nous avons observé une différence significative entre les groupes Li et Na.

La valeur en rouge indique que le marquage est plus élevé chez les rats Na que chez les Li.

 Région cérébrale où le pourcentage de variation entre les animaux Li et Na augmente avec l'âge

Ces pourcentages sont calculés pour les expressions de Fos (tableau 23-A) et de Zif268 (tableau 23-B) lors du rappel de l'AOPG en présence soit de l'odeur, soit du goût.

Au cours du vieillissement, nous constatons que le nombre de structures où existe une différence significative de l'expression de Fos ou de Zif268 entre les animaux Li et Na diminue avec l'âge même si certaines, comme le CP ou le BLA, sont activées sélectivement par le rappel de l'AOPG dans les trois groupes de rats considérés.

Nous observons aussi que le pourcentage de variation d'immunoréactivité entre les groupes conditionnés Li et Na augmente avec l'âge dans quelques régions cérébrales:

- le noyau basolatéral, où seule la variation de l'expression de Fos augmente avec l'âge lorsque les animaux sont testés en présence de l'odeur. En présence du goût, ce sont les pourcentages de variation d'expression de Fos et de Zif268 qui augmentent tous deux avec l'âge.
- le noyau central de l'amygdale, mais seulement pour l'expression de Zif268 lors du rappel de l'AOPG par l'odeur, et cela uniquement entre les jeunes et les adultes.
- les régions CA1 et CA3 où la variation d'expression de Fos entre les rats Li et Na n'augmente qu'entre les jeunes et les adultes.
- le CI, où seule la présentation du goût entraîne une différence de marquage Zif268 entre les animaux Li et Na plus importante chez les adultes que chez les jeunes.

Dans les cortex piriforme, entorhinal, orbito-frontal et préfrontal médian, l'âge ne semble avoir que peu d'effets sur les variations d'expression de Fos et Zif268 entre les groupes Li et Na. En effet, dans ces trois régions, ces pourcentages sont quasiment similaires quelque soit l'âge considéré lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur.

Enfin, nous notons également que le pourcentage de variation du nombre de cellules marquées entre les animaux Li et Na diminue parfois avec l'âge. Ceci n'est observé pour l'expression de Fos que dans le CI, lors de la présentation de l'odeur, et le champ CA1, en présence du goût, ainsi que pour l'expression de Zif268 dans le BLA, lors de la stimulation par l'odeur.

Ces pourcentages de variation du marquage Fos et/ou Zif268 indiquent que les motifs d'activation évoluent au cours du vieillissement selon deux dimensions :

- premièrement, dans le sens d'une diminution globale du nombre de structures activées par le rappel de l'AOPG, et ceci en présence de l'odeur ou du goût et pour les deux marqueurs.
- deuxièmement, dans le sens d'une variabilité de la différence de marquage entre les groupes Li et Na qui soit reste similaire, soit diminue, soit augmente avec l'âge selon les structures considérées. Enfin, nous pouvons noter que cette variabilité en fonction de l'âge paraît plus marquée pour le marquage Fos que pour celui de Zif268 avec lequel nous n'observons que peu d'évolution du pourcentage de variation de l'immunoréactivité.

∞ Résumé des Résultats ∞

Tableau 24: Évolution, au cours du vieillissement, des performances des animaux selon les tâches comportementales étudiées.

	TRO		TDO		TRGi				AOPG							
					App 1		App 2		Rappel en présence de l'odeur			Rappel en présence du goût				
	App	Rap	App	Rap	App	Rap	App	Rap	Aversif?	CA	Fos	Zif	Aversif?	CA	Fos	Zif
J	+	+	+	+	+	+	+	+	OUI	CA (od) se renforce	9	6	OUI	CA (G) stable	5	1
A	+	+	+	+	+	+	+	+	OUI		8	3	OUI		2	4
S	+	-	+	+	-	-	-	-	OUI		7	2	OUI		NA	NA

Augmentation des perturbations avec l'âge

Augmentation des perturbations chez les rats sénescents lorsqu'ils ont soumis à une tâche hippocampe-dépendante

Tous les animaux conditionnés sont aversifs

Légende

- J : Rats jeunes
- A : Rats adultes
- S : Rats sénescents
- +
-
- TRO : Tâche de reconnaissance d'objets
- TDO : Tâche de reconnaissance d'objets olfactive
- TRGi : Tâche de retour au gîte
- Aversif? : les animaux conditionnés sont-ils aversifs?
- CA: Coefficient d'aversion
- Fos: Nombre de structures présentant une différence significative de l'expression de Fos
- Zif: Nombre de structures présentant une différence significative de l'expression de Zif268
- TRO : Tâche de reconnaissance d'objets
- TDO : Tâche de discrimination olfactive
- App : Sessions d'apprentissage
- Rap : Session de rappel

Nos données comportementales, comme le montre le tableau 24, mettent en évidence des modifications des capacités cognitives des rats liées à l'âge. Si la rétention à court-terme des informations ne semble pas significativement altérée chez les rats sénescents dans nos conditions expérimentales comme le montrent les résultats de la tâche de reconnaissance d'objet, la rétention à long-terme et en particulier la mémoire spatiale sont perturbées puisque le nombre d'animaux capables d'acquérir la tâche de discrimination olfactive ou la tâche de retour au gîte est plus faible chez les rats sénescents. En effet, en vieillissant, ces animaux ont besoin d'un plus grand nombre d'essais pour atteindre le critère d'apprentissage. Nous observons aussi une altération importante du rappel dans le cas de la tâche spatiale, toutefois, la rétention de la tâche olfactive n'est pas significativement modifiée. Ces résultats indiquent donc un effet du vieillissement, qui s'exerce de façon différente selon la nature, olfactive ou spatiale, des informations (tableau 24), sur les capacités d'apprentissage et de rétention (pour un rappel deux jours après l'apprentissage).

Par contre, quelles que soient leurs capacités mnésiques, les rats jeunes, les adultes ou les sénescents sont tous capables d'acquérir et de se rappeler l'AOPG et développent tous une aversion vis-à-vis des deux stimuli conditionnels, odeur ou goût (tableau 24). De plus, les coefficients d'aversion montrent que la force de l'aversion envers la saccharine varie peu en fonction de l'âge, mais que celle pour le benzaldéhyde a tendance à se renforcer chez les rats sénescents.

Ces résultats indiquent donc que l'AOPG constitue un apprentissage particulier pour lequel ni l'acquisition ni la rétention ne semblent soumis aux effets délétères du vieillissement. De plus, l'expression de l'AOPG évoquée par l'odeur s'accroît même avec l'âge.

Les résultats de la cartographie par détection immunohistochimique des protéines Fos et Zif268 montrent que les régions cérébrales activées lors de l'expression de l'AOPG varient (figure 44):

- selon le **marqueur**, Fos ou Zif268, considéré, le nombre de structures cérébrales exprimant Fos est le plus souvent supérieur à celui des aires exprimant Zif268.
- selon la **nature du stimulus** utilisé lors du rappel (odeur versus goût);
- selon l'**âge des animaux**;

Figure 44: Résumé des motifs d'expression de Fos (A) et Zif268 (B) selon le stimulus utilisé lors du rappel et selon l'âge des animaux.

A: Expression de Fos

A-1: Expression de Fos lors du rappel en présence de l'odeur

J	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI
A	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI
S	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI*

A-2: Expression de Fos lors du rappel en présence du goût

J	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI
A	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI

B: Expression de Zif268

B-1: Expression de Zif268 lors du rappel en présence de l'odeur

J	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI
A	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI
S	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI

B-2: Expression de Zif268 lors du rappel en présence du goût

J	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI
A	CPa	CPp	BLA	Ce	Med	CE	CA1	CA3	GD	COF	CPFm	CI

Légendes:

Régions où l'expression de Fos ou de Zif268 est significativement plus importante chez les rats Li par rapport aux rats Na.

Structures activés quel que soit l'âge étudié

J: rats jeunes
A: rats adultes
S: rats sénescents

*: les animaux Na sont significativement plus marqués que les Li

La figure 45 illustre les différents patterns d'activation que nous avons mis en évidence chez les rats jeunes, les adultes et les sénescents, selon le stimulus conditionnel présenté lors du rappel de l'AOPG.

Expression de Fos :

Le nombre de cellules immunoréactives à la protéine Fos est significativement modifié chez les rats aversifs comparés aux rats non-aversifs lorsque le rappel de l'AOPG est évoqué:

- par la *présentation de l'odeur*, dans :
 - le cortex piriforme, le noyau basolatéral de l'amygdale et le cortex insulaire quel que soit l'âge des rats.
 - le cortex orbito-frontal et les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe chez les jeunes et les adultes.
 - le cortex préfrontal médian et le cortex entorhinal, chez les jeunes et les sénescents.
 - le noyau médian de l'amygdale chez les rats sénescents uniquement.
- par la *présentation du goût*, dans :
 - le noyau basolatéral de l'amygdale et le champ CA1 de l'hippocampe chez les rats jeunes et les adultes.
 - le champ CA3, et les cortex orbito-frontal et médian chez les rats jeunes uniquement.

En résumé, le nombre de régions montrant une modification significative de l'*expression de Fos* chez les rats aversifs soumis à l'odeur est légèrement inférieur chez les rats adultes et sénescents comparés aux rats jeunes. Cependant, le CP, le CI et le BLA restent significativement activés chez les rats sénescents. Chez ces derniers, on note une absence d'activation significative de l'hippocampe et du cortex orbito-frontal, contrairement aux rats jeunes et adultes. Lors du rappel de l'AOPG évoqué par le goût, les rats jeunes ainsi que les rats adultes montrent une activation de l'hippocampe et du BLA. Soulignons que les jeunes présentent une activation significative des régions frontales qui n'est plus observée chez les adultes.

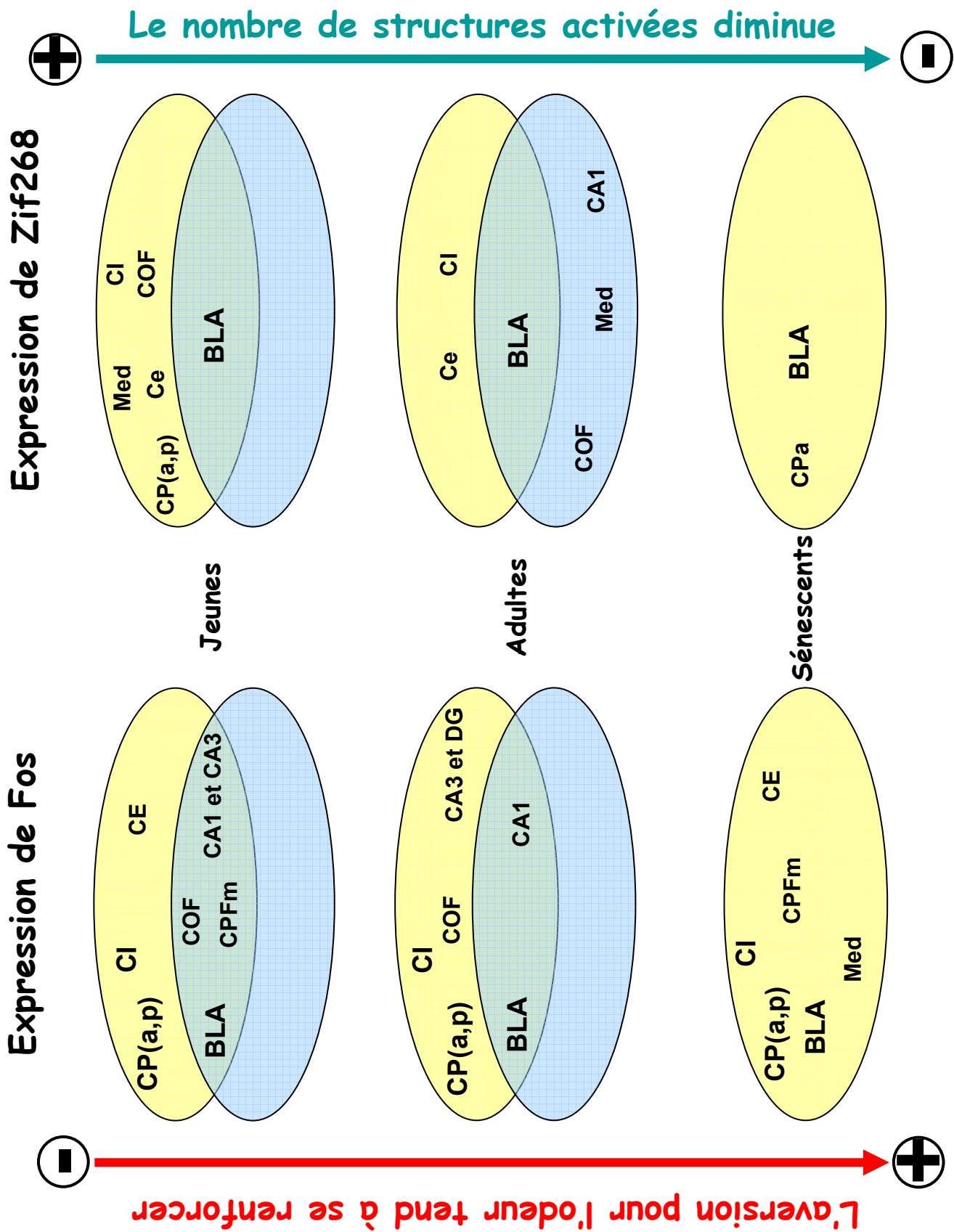


Figure 45: Résumé des structures où l'on observe une différence significative entre les animaux Li et Na en présence de l'odeur seule (en jaune), du goût seul (bleu) ou des deux stimuli (en vert) pour les deux marqueurs Fos et Zif268.

Expression de Zif268 :

Le nombre de cellules immunoréactives à la protéine Zif268 est significativement modifié chez les rats aversifs comparés aux rats non-aversifs lorsque le rappel de l'AOPG est évoqué:

- par la **présentation de l'odeur**, dans :
 - le noyau basolatéral de l'amygdale, quel que soit l'âge des rats.
 - le noyau central, le cortex orbito-frontal et le cortex insulaire chez les jeunes et les adultes.
 - le cortex piriforme antérieur chez les jeunes et les sénescents.
- par la **présentation du goût**, dans :
 - le noyau basolatéral de l'amygdale chez les rats jeunes et les adultes.
 - le noyau médian de l'amygdale, le cortex orbito-frontal et la région CA1 de l'hippocampe chez les adultes uniquement.

(Comme nous l'avons précisé auparavant, nous ne disposons pas des données concernant les rats sénescents, à la suite à un problème d'histologie)

En résumé, il apparaît que le nombre de régions montrant une modification significative de l'**expression de Zif268** chez les rats aversifs soumis à l'odeur est plus élevé chez les rats jeunes que chez les adultes et les sénescents. Lorsque les rats sont mis en présence du goût lors du rappel de l'AOPG, seul le BLA présente un changement significatif de l'expression de Zif268 chez les rats jeunes. Au contraire, le nombre de régions activées est plus élevé lors du rappel induit par le goût chez les rats adultes. Ainsi, le Med, le COF et CA1 ne sont activés que par la présentation du goût lors du rappel chez les adultes.

En conclusion, outre le fait que l'AOPG constitue un apprentissage particulier résistant aux effets délétères du vieillissement, nous avons mis en évidence que les patterns d'activation cérébrale, observés lors du rappel de l'AOPG par l'expression des marqueurs Fos et Zif268, diffèrent selon la nature du stimulus conditionnel présenté, le marqueur considéré et l'âge des animaux, même si le **noyau basolatéral de l'amygdale**, est toujours activé.

∞ Discussion ∞

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes attachés à décrire l'impact de l'âge sur le rappel de l'aversion olfactive potentialisée par le goût par des approches comportementale et de neuro-anatomie fonctionnelle. Nous observons que, contrairement à d'autres types d'apprentissage, l'expression de l'AOPG n'est pas altérée par le vieillissement. Nos résultats, basés sur la détection de gènes précoces, indiquent que les réseaux activés diffèrent:

- à un âge donné, selon le stimulus, odeur ou goût, utilisé pour le rappel;
- selon les marqueurs, Fos ou Zif268, considérés;
- selon l'âge des rats.

Il apparaît donc que le rappel de l'AOPG constitue un phénomène complexe et que différents paramètres sont susceptibles d'intervenir sur le substrat neuro-anatomique impliqué.

Dans ce chapitre, après avoir examiné certains aspects méthodologiques liés à nos travaux, nous discuterons l'apport de nos résultats issus de l'immunocytochimie des protéines Fos et Zif268 par rapport aux données bibliographiques, en soulignant dans quelle mesure ils participent à une meilleure compréhension des réseaux cérébraux impliqués dans le rappel de l'AOPG. A partir de tous ces éléments, nous proposerons un modèle hypothétique pouvant rendre compte des circuits centraux qui sous-tendent l'expression de l'aversion pour l'odeur ou le goût.

I. L'AOPG : Aspects méthodologiques.

I.1. Validation du protocole d'aversion olfactive potentialisée par le goût.

I.1.a. AOPG versus AOC : délai entre la présentation des stimuli conditionnels et l'induction du malaise par l'injection de LiCl.

L'AOPG est un phénomène dans lequel une aversion pour une odeur est potentialisée par le goût. De ce fait, il convenait de s'assurer que l'aversion que nous observions pour le composé odorant ne correspondait pas à une simple AOC. C'est pour cette raison que nous avons comparé nos résultats obtenus avec un délai de trente minutes entre la présentation des

stimulations olfactive et gustative et l'induction du malaise gastro-intestinal à ceux recueillis lorsque l'odeur seule est suivie, trente minutes plus tard, de l'injection de LiCl. Dans ce cas, nous n'observons pas d'aversion pour l'odeur. Ainsi, avec un tel délai, les animaux sont incapables d'acquérir une AOC, quelle que soit la nature de l'odeur utilisée (géraniol ou benzaldéhyde), mais acquièrent bien une AOPG. Ces données sont en accord avec celles de la littérature (Palmerino et al. 1980 ; Ferry et al. 1995).

Ce premier point établi, nous avons mené des travaux préliminaires afin de mettre au point le protocole d'acquisition et de rappel d'une AOPG et de déterminer les conditions optimales de son obtention.

I.1.b. AOPG : influence de la nature du stimulus olfactif.

Nous avons vérifié si l'apprentissage et le rappel de l'AOPG pouvaient être induits par différentes odeurs. En effet, dans la littérature, la majorité des études portant sur l'AOPG utilisent le benzaldéhyde comme odeur lors de l'acquisition de l'aversion, mais quelques unes emploient aussi l'acétate d'isoamyle (Batson et Batsell 1999, Inui et al. 2006). Nos résultats montrent que, chez le Rat, l'AOPG s'établit, que ce soit avec le géraniol ou le benzaldéhyde. Ainsi, nos données étayent le fait que des odeurs variées peuvent acquérir une valeur aversive lorsqu'elles sont présentées simultanément à un goût et suivies de l'induction d'un malaise (tableaux 1A et 1B du chapitre Introduction). Toutefois, nos résultats montrent qu'un nombre nettement plus élevé de rats développe une aversion pour le benzaldéhyde, c'est donc ce stimulus que nous avons choisi pour la suite de notre travail.

I.1.c. AOPG : influence de la souche de Rat.

De nombreuses souches de Rat sont utilisées lors des études comportementales. Dans la littérature, les travaux consacrés aux apprentissages olfacto-gustatifs sont menés chez des rats de souches différentes, Wistar, Sprague Dawley, Fischer, Long Evans par exemple, et il est admis que leurs performances mnésiques ne sont pas similaires (Andrews 1996 ; Clements et al. 2007). Cependant, à notre connaissance, aucune étude comparant leur capacité à acquérir et exprimer une AOPG n'a été menée. Disposant dans notre groupe de travail, de nombreuses données comportementales concernant la souche Wistar (Datiche et al. 2001 ; Rouillet et al. 2004, 2005), nous avons voulu comparer ses performances en matière d'AOPG avec la souche Sprague Dawley, souvent employée, selon la littérature, pour ce type d'expérience. Dans ce

but, nous avons soumis des rats Sprague Dawley et des Wistar à l'acquisition et au rappel de l'AOPG en utilisant comme stimulus olfactif le géraniol ou le benzaldéhyde. Quelle que soit l'odeur utilisée, les rats Sprague Dawley ou Wistar développent une aversion. Néanmoins, au vu de ces résultats, et pour des facilités d'obtention des différents groupes d'âge choisis, nous avons décidé d'utiliser dans ce travail des rats Sprague Dawley.

I.1.d. Le dispositif expérimental: influence possible du nombre de biberons présentés au rat lors de l'acquisition et du rappel de l'AOPG ?

Dans notre protocole, nous avons opté pour conditionner les rats et tester l'AOPG avec un seul biberon, ce qui permet de mesurer directement l'expression de l'aversion (Batsell et Best 1993). En effet, les protocoles utilisant deux biberons n'autorisent qu'une mesure indirecte de l'aversion par évaluation de la préférence des animaux pour une solution qui n'a pas été associée à un malaise (Ferry et al. 1995). Cependant, avec un seul biberon, il existe une compétition entre deux motivations: la soif et l'aversion. En effet, dans notre protocole d'AOPG, les animaux, ne peuvent boire que lorsqu'ils sont introduits dans les lickomètres. Ainsi, on ne peut exclure que certains d'entre eux, bien qu'avérsifs, ne consomment un peu d'eau pour compenser leur soif.

I.1.e. AOPG: choix du mode de stimulation par l'odeur et par le goût.

Comme notre propos était de différencier les réseaux activés par l'odeur ou le goût lors du rappel de l'AOPG, nous avons décidé de délivrer le goût et l'odeur simultanément mais de façon séparée. Dans certaines études, ces deux stimuli sont mélangés de façon à stimuler les animaux par une flaveur (Rusiniak et al. 1979 ; Durlach et Rescorla 1980 ; Miller et al. 1986 ; Bouton et al. 1986 ; Bryant et al. 1993), alors que dans d'autres, les stimulations conditionnelles sont séparées (Palmerino et al. 1980 ; Rusiniak et al. 1982a ; Lasiter et al. 1984 ; Holder et Garcia 1987 ; Schneider et Pinnow 1994 ; Hatfield et al. 1992 ; Ferry et al. 1995 ; Inui et al. 2006). Toutefois, bien que le goût (dans le biberon) et l'odeur (sur un disque proche de l'ouverture de l'embout du biberon) soient séparés, leur présentation reste contiguë à la fois dans l'espace et dans le temps permettant ainsi l'acquisition de l'AOPG (Coburn et al. 1984 ; Holder et Garcia 1987), même si cette situation est peut-être moins « éthologique » que la présentation mélangée de l'odeur et du goût (Paradis et Cabanac 2004).

I.1.f. AOPG: choix du groupe témoin.

Pour s'assurer que l'aversion résulte bien d'une association entre les stimulations conditionnelles (odeur et goût) et la stimulation inconditionnelle (le malaise vicéral) nous avons comparé les résultats obtenus à ceux d'un groupe de témoins: Na. Les animaux de ce groupe, bien que soumis aux mêmes conditions expérimentales que les animaux Li (restriction hydrique, même contexte expérimental, présentation de l'odeur et du goût) n'acquièrent pas l'AOPG puisque le NaCl n'induit pas de malaise gastro-intestinal. Ce groupe nous permet donc de vérifier que la douleur éventuelle, due à l'injection, n'est pas capable, à elle seule, d'induire une aversion.

I.2. Détection immunocytochimique de l'expression cérébrale des protéines Fos et Zif268.

I.2.a. Les protéines Fos et Zif268, marqueurs d'activité et de neuroplasticité.

Les protéines Fos et Zif268, codées par les gènes précoces *c-fos* et *zif268* sont des facteurs de transcription capables d'induire l'activation de gènes cibles, dit tardifs (Herdegen et Leah 1998), participant à des phénomènes de plasticité neuronale (Herrera et Robertson 1996; Knapska et Kaczmarek 2004). La détection de Fos et Zif268 par immunocytochimie, fréquemment utilisée, permet de cartographier les régions du cerveau participant à l'apprentissage et/ou au rappel d'informations et d'effectuer des comptages cellulaires (Hall et al. 2001 ; Datiche et al. 2001 ; Tronel et Sara 2002 ; Bozon et al. 2002, 2003 ; Roullet et al. 2005). C'est par cette approche que nous avons choisi d'analyser le réseau cérébral mis en jeu lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur ou du goût. Il faut souligner que la détection de ces deux protéines offre des informations complémentaires (Farivar et al. 2004). Les relations qui unissent les modifications d'efficacité synaptique survenant lors de l'apprentissage et les voies de signalisation qui gouvernent l'expression des différents gènes précoces sont loin d'être identifiées. Par exemple, l'induction de PLT dans l'hippocampe entraîne une induction de *zif268* mais pas de *c-fos* (Wisden et al. 1990). De plus, le rôle exact des protéines Fos et Zif268 dans la mémoire n'est pas encore clairement défini. Néanmoins, elles semblent être toutes deux impliquées dans l'orchestration des modifications cellulaires (renforcement synaptique, croissance cellulaire par exemple) conduisant à des modifications du phénotype neuronal, mais les événements intracellulaires qu'elles mettent en jeu diffèrent

vraisemblablement. Alors que l'expression de Zif268 semble être plus directement liée aux phénomènes de plasticité (Herdegen et Leah 1998 ; Bozon et al. 2002, 2003 ; Davis et al. 2003), celle de Fos est induite par certains processus mnésiques mais aussi par l'activité neuronale liée au seul traitement sensoriel de l'information. Comme le souligne Kaczmarek (2002), Fos pourrait être un détecteur de coïncidence au niveau cellulaire car son activation résulterait de la convergence de plusieurs types d'informations (sensorielles, motivationnelles, viscérales...) mais reflèterait également les phénomènes de neuroplasticité requis pour la consolidation d'informations acquises. Ainsi, l'utilisation d'oligonucléotides antisens bloquant l'expression de Fos perturbe la consolidation à long-terme d'une information aversive tandis que son acquisition et la mémoire à court-terme sont préservées (Lamprecht et Dudai 1996).

I.2.b. Expression de Fos et Zif268: choix des groupes témoins.

Il est connu que de nombreux stimuli, indépendamment de tout apprentissage ou de tout rappel, peuvent induire l'expression de Fos (Herrera et Robertson 1996) mais aussi de Zif268 (Yamada et al. 1999, Filipowski et al. 2001). Il est donc nécessaire d'utiliser des témoins adéquats afin de mettre en évidence l'immunoréactivité qui reflète réellement l'activation cérébrale qui sous-tend le rappel de l'AOPG. Dans ce but, nous avons donc utilisé des lots de rats témoins recevant du NaCl le jour de l'acquisition et stimulés par l'odeur ou par le goût le jour du rappel. La comparaison de l'expression de Fos et Zif268 chez ces différents groupes de rats (Li versus Na) permet d'étudier l'activation cérébrale en relation avec le rappel de l'AOPG et non pas seulement celle induite par les stimulations sensorielles, le contexte expérimental ou la manipulation des animaux.

Nous avons également utilisé un groupe de rats dits "contrôles" qui ne quittent jamais leurs cages pour déterminer le niveau d'expression basale de Fos et de Zif268. Ce groupe contrôle s'avère très important, notamment pour l'analyse de l'induction de l'expression de Zif268 qui montre un taux d'expression constitutif très élevé dans l'hippocampe et les régions corticales (Kaczmarek 2000).

I.2.c. Influence de la durée de la stimulation.

Un autre point qu'il convient de souligner concerne la durée de stimulation à laquelle les rats aversifs ou témoins sont soumis le jour du rappel de l'AOPG.

La stimulation olfactive (signal sensoriel distal) va s'exercer pendant toute la durée de la session (10 minutes). Ainsi, la différence d'expression des marqueurs Fos et Zif268 entre les rats Li-O et les Na-O reflétera l'activation cérébrale liée aux processus mnésiques mis en jeu le jour du rappel chez les Li-O.

Lorsque les rats aversifs Li-G sont placés en présence du goût (biberon contenant la saccharine, signal sensoriel proximal), ils n'effectuent que quelques lapées. Au contraire, les rats témoins Na-G, qui n'ont pas ressenti de malaise viscéral deux jours auparavant, consomment une grande quantité de saccharine, ce qui traduit vraisemblablement la valeur hédonique positive de la saccharine. Dans ces conditions, on ne peut pas exclure que, dans certaines régions cérébrales (par exemple le cortex insulaire), la différence de durée de stimulation gustative entre rats Li-G et Na-G pourrait masquer, au moins partiellement, la mise en évidence de l'expression des marqueurs Fos ou Zif268 induite par le rappel de l'AOPG.

I.2.d. Expression différentielle de Fos et Zif268 dans certaines régions cérébrales

Nos expériences mettent en évidence des différences d'expression de Fos et de Zif268. Ainsi, chez les rats aversifs, certaines régions montrent une modification significative de l'expression de Zif268 mais pas de Fos, et vice versa. Cela souligne le fait qu'il ne semble pas exister une mise en jeu similaire des gènes précoces codant ces protéines dans une région cérébrale donnée. On peut aussi supposer que différents phénomènes de régulation pourraient s'exercer sur Fos et Zif268 (Guzowski et al. 2001). En effet, les cascades intracellulaires conduisant à l'activation de ces GPIs, ou à la mise en jeu des acteurs de leur régulation ne sont sans doute pas identiques. Notons également qu'en fonction des influences neuromodulatrices qui s'exercent sur la cellule, il est possible d'observer une activation différentielle des GPIs (Herrera et Robertson 1996 ; Farivar et al. 2004).

D'autre part, des travaux suggèrent que les gènes précoces pourraient se distinguer par leur seuil d'induction lorsqu'un stimulus donné est appliqué. Dans leurs études sur la corrélation entre l'induction de la PLT dans l'hippocampe et l'expression de GPIs, Abraham et al. (1993) ainsi que Worley et al. (1993) ont montré que pour une même intensité de stimulation induisant une PLT l'expression de Zif268 est fortement augmentée, tandis que celle de Fos ne l'est que modérément. L'expression des gènes précoces codant les facteurs de transcription Fos et Zif268 n'est pas forcément coordonnée et cela pourrait avoir des conséquences diverses sur le plan des processus de neuroplasticité. Il faut aussi souligner que

notre approche ne permet pas de déterminer si ce sont, ou non, les mêmes cellules qui expriment à la fois Fos et Zif 268, ni si ce sont, ou non, les mêmes cellules qui sont activées selon le stimulus conditionnel ou l'âge de l'animal.

Enfin, la plupart des structures que nous avons examinées sont connectées directement ou indirectement, formant ainsi des circuits. Ceci peut aussi avoir un impact sur le niveau d'augmentation de l'expression de Fos et/ou de Zif268 lors de la présentation de l'un ou l'autre des stimuli conditionnels dans certaines régions d'un réseau donné (Guzowski et al. 2001).

I.2.e. Expression de Fos et Zif268 et substrat neuronal sous-tendant le rappel de l'AOPG

On peut supposer que le degré d'expression des protéines Fos et Zif268 dans les régions étudiées lors du rappel reflèterait leur implication dans la réponse comportementale d'aversion. Toutefois, comme le soulignent certaines études utilisant la détection de gènes précoces, il n'est pas aisé de corréliser leur niveau d'expression avec les données comportementales (Guzowski et al. 2001). Certains travaux montrent que, bien qu'exprimées dans une structure donnée, Fos et Zif268 ne sont pas forcément nécessaires à la performance de l'animal. Par exemple, l'amygdale peut montrer une immunoréactivité à la protéine Fos lors de l'expression d'une AGC, mais l'absence de Fos, via l'utilisation d'oligonucléotides antisens anti-fos, dans cette même région peut rester sans effet sur le rappel (Yasoshima et al. 2006).

Enfin, il faut souligner que, dans nos conditions expérimentales nous avons étudié le rappel de l'AOPG. Le « rappel » est vraisemblablement à l'origine de phénomènes complexes. Comme l'a suggéré Nader (2003), l'information acquise passerait d'une forme inactive à une forme active lors de sa réactivation. Ces phénomènes ont été observés dans différentes régions cérébrales et avec différents paradigmes expérimentaux. D'autre part, dans notre protocole de rappel de l'AOPG, le stimulus conditionnel est présenté seul, sans être suivi du stimulus inconditionnel; on ne peut alors pas exclure que des phénomènes cellulaires en relation avec un début d'extinction ne se mettent en place, et cela même si l'AOPG est un apprentissage robuste. Les expressions de Fos et de Zif268 pourraient ainsi rendre compte de ces processus complexes et donc expliquer en partie les différences observées dans ce travail entre les patterns de marquage.

En résumé, comme toute approche méthodologique, la détection immunohistochimique de Fos et Zif268 présente certaines limites mais elle n'en demeure pas moins un outil d'investigation efficace qui nous a permis de cartographier les régions cérébrales activées lors du rappel de l'AOPG. A l'évidence, le rôle des régions montrant une modification de l'expression de Fos et Zif268 restera à préciser par des approches fonctionnelles comme, par exemple, l'utilisation d'oligonucléotides antisens empêchant l'expression de certains gènes précoces immédiats.

II. Impact du vieillissement sur les capacités cognitives du Rat.

Comme nous l'avons indiqué dans l'introduction de ce travail, la sénescence s'accompagne de nombreux changements qui affectent les capacités cognitives et se reflètent sur le comportement de l'animal. Ainsi, avant de soumettre les rats au protocole de l'AOPG, il s'avérait important de vérifier s'il existait, chez les rats utilisés, d'éventuelles altérations cognitives liées à l'âge. Dans ce but, nous avons mis en place une étude comportementale utilisant plusieurs apprentissages les moins stressants possibles, sans renforcement négatif, et ne nécessitant pas une grande activité locomotrice afin de ne pas désavantager les rats sénescents. Nous avons choisi plusieurs tests afin d'analyser différents aspects des capacités cognitives du rat, que ce soit au niveau de l'apprentissage ou du rappel.

II.1. Influence de l'âge sur la reconnaissance d'objets : étude de la mémoire à court-terme.

La tâche de reconnaissance d'objet, facile à mettre en œuvre et n'induisant que peu de stress (Mumby 2004), est fréquemment utilisée dans la littérature afin d'examiner rapidement les capacités mnésiques de l'animal après lésion de régions cérébrales (Astur et al. 2002) ou lors de l'administration de substances psychotropes (Kosiorek et al. 2003 ; O'Shea et al. 2006). Le délai de 2 minutes entre les présentations des paires d'objets nous permet d'évaluer la capacité de mémorisation à court-terme chez les rats d'âges différents.

Dans cette tâche nous observons que, tous les rats, quel que soit leur âge, passent toujours plus de temps à explorer un nouvel objet qu'un objet déjà connu. Ces données

indiquent que, dans nos conditions expérimentales, la mémoire de reconnaissance n'est pas altérée avec le vieillissement, en accord avec les travaux de Willig et al. (1987).

D'autre part, le temps total d'exploration (c'est-à-dire le temps passé à explorer tous les objets et l'enceinte expérimentale) est significativement plus grand chez les animaux jeunes que chez les adultes et les sénescents. Ainsi, nous observons, dès l'âge adulte, une diminution de l'activité exploratoire qui se maintient chez les rats plus âgés. Ces résultats sont également en accord avec ceux de Willig et al. (1987) qui montraient une telle diminution chez des animaux âgés de 24-27 mois comparés à des jeunes lors d'une tâche de reconnaissance d'objet et lorsque les animaux étaient placés dans un nouvel environnement, cette diminution d'activité pourrait tenir à une variation, en fonction de l'âge, de la motivation à explorer.

II.2. Influence de l'âge sur une discrimination olfactive: acquisition, mémoire à long- terme et rappel.

Cette tâche, dans laquelle les rats doivent apprendre à associer une odeur, parmi trois, à l'obtention d'une récompense alimentaire permet, non seulement d'évaluer leur vitesse d'apprentissage, mais également leur mémoire à long terme puisque le test de rappel a lieu deux jours après l'acquisition.

Nos résultats indiquent que, si la majorité des rats jeunes et des adultes réussissent rapidement à acquérir cette tâche, seulement un peu moins de la moitié des sénescents y parvient. De plus, un nombre plus élevé d'essais leur est nécessaire pour atteindre le critère de réussite. Cependant, lors du rappel, nous n'observons pas de modification de la performance en fonction de l'âge. Ainsi, le vieillissement semble donc avoir un impact plus marqué sur la phase d'acquisition que sur la mémoire à long-terme et le rappel.

Ces résultats confortent ceux de Roman et al. (1996) qui montrent qu'un faible pourcentage seulement de rats âgés est capable d'apprendre une discrimination olfactive de type Go-NoGo. Ce déficit d'apprentissage que nous constatons chez les rats sénescents pourrait tenir, non pas au seul déficit mnésique, mais aussi à une diminution éventuelle de leur sensibilité aux odeurs. Toutefois, selon Kraemer et Appfelbach (2004), des rats très âgés sont toujours capables de discriminer des odeurs mêmes très diluées. Ainsi, ces résultats montrent

que les rats sénescents restent capables de détecter et de discriminer des signaux olfactifs, même si cela leur est plus difficile que pour les jeunes animaux. Cependant, dans nos conditions expérimentales, nous ne pouvons exclure qu'au moins certains des rats n'ayant pas réussi à acquérir cette tâche présentaient une altération de leur sensibilité aux odeurs plutôt que de leurs capacités d'apprentissage. Néanmoins, cette hypothèse ne semble pas tenir quand on considère que tous les rats, même sénescents, acquerraient l'AOPG.

II.3. Influence de l'âge sur la mémoire spatiale (tâche de retour au gîte): acquisition, mémoire à long-terme et rappel.

On sait que certaines régions du cerveau, tel l'hippocampe, sont très sensibles aux effets du vieillissement. Or, cette structure joue un rôle clef dans les processus mnésiques et les apprentissages spatiaux dits hippocampe-dépendants. Ces derniers sont couramment utilisés pour évaluer l'état cognitif des animaux âgés. Cependant, une tâche comme le labyrinthe aquatique de Morris (Morris 1981) est très stressante pour les rats et requiert une activité motrice soutenue car ils doivent nager jusqu'à une plateforme cachée dans le dispositif; ce qui peut être préjudiciable pour des animaux sénescents. Afin d'examiner les capacités cognitives de nos différents groupes d'animaux, nous avons donc choisi de les soumettre, avant de procéder au protocole de l'AOPG, à une tâche spatiale nécessitant une performance physique moindre que la piscine de Morris et ne générant que peu de stress: la tâche de retour au gîte. Plusieurs variantes sont décrites dans la littérature. Barnes (1979a) avait utilisé un apprentissage spatial basé sur la tendance naturelle des rats à fuir les endroits très éclairés et ne présentant pas de refuges possibles. Sur une plateforme circulaire percée de nombreux trous, les animaux, placés au centre du dispositif, doivent trouver celui qui leur permet de rejoindre une cage localisée sous le dispositif et ainsi de fuir cet environnement. En se basant sur ce principe, Schenk (1989) a développé une variante comportant moins d'issues possibles et permettant de travailler sur plusieurs aspects liés au comportement tels que l'étude des effets de lésions cérébrales (Brandner et Schenk 1998), la sélection d'animaux « knock out » (Spreng et al. 2001) ou le vieillissement (Rossier et Schenk 2003). Nous avons donc utilisé un dispositif de retour au gîte similaire à celui décrit par Rossier et Schenk (2003).

Nos résultats montrent que la majorité des animaux jeunes et des adultes sont capables d'apprendre et de se rappeler correctement la localisation de la sortie lors des deux

apprentissages successifs basés sur deux configurations spatiales du dispositif. Par contre, un peu moins de la moitié des rats sénescents acquièrent cette tâche et ces animaux présentent aussi un déficit marqué de leurs performances lors du rappel. L'examen du nombre d'essais nécessaires pour atteindre le critère de réussite met en évidence deux différences entre les trois groupes de rats:

- ce nombre n'est pas différent entre les trois âges étudiés lors du premier apprentissage, bien qu'il soit plus important chez les adultes et les sénescents que chez les jeunes;
- il diminue significativement entre le premier et le second apprentissage pour les jeunes mais reste constant chez les plus âgés.

Ces données indiquent que, lors d'une tâche spatiale, les animaux sénescents présentent d'importants déficits de leurs capacités d'apprentissage et de rappel par rapport aux jeunes et aux adultes. Ces observations sont en accord avec celles de la littérature qui indiquent une perturbation de la mémoire spatiale avec l'âge aussi bien chez le Rat que chez l'Homme (Barnes 1979a, Barnes et al. 1980a ; Frick et al. 1995 ; Rosenzweig et al. 1997 ; Shen et al. 1997 ; Newman et Kaszniack 2000 ; Moffat et al. 2001 ; Grandchamp et Schenk 2006) et la nécessité, chez les animaux sénescents, d'un plus grand nombre d'essais que chez des sujets plus jeunes pour atteindre le critère de réussite prédéfini (Gallagher et al. 1985 ; Barnes et al. 1990 ; Mizumori et al. 1996 ; Ward et al. 1999). Enfin, il convient de souligner que, même si de nombreux animaux sénescents sont perturbés lors d'une tâche spatiale (Barnes et al. 1980a), certains arrivent néanmoins à mettre en place des stratégies efficaces pour acquérir un tel apprentissage (Rossier et Schenk 2003). Ces études suggèrent une relation directe, au cours du vieillissement, entre ces altérations mnésiques et la perte de fonctionnalité de l'hippocampe (Shen et al. 1997 ; Tanila et al. 1997 ; Wilson et al. 2004 ; Rosenzweig et Barnes 2003). En effet, différents aspects de sa physiologie sont perturbés (Burkes et Barnes, 2006), ce qui pourrait retentir sur le comportement et la mémoire, depuis des troubles de l'attention jusqu'à des déficits très marqués des capacités cognitives (Winocur 1988 ; Leblanc et Soffie 1999 ; Smith et Mizumori 2006). Toutefois, on ne peut totalement exclure que les faibles performances des animaux sénescents, même s'ils sont mobiles pendant la tâche, ne soient en partie dues à des perturbations de l'activité motrice qui apparaissent avec l'âge.

II.4. Vieillessement et capacités cognitives chez le Rat.

Au terme de cette première partie de notre étude, les résultats obtenus permettent de conclure à un effet significatif de l'âge sur les capacités mnésiques du Rat: lors du vieillissement non-pathologique, plus les animaux sont âgés, plus leurs difficultés à apprendre, mémoriser et se rappeler une tâche augmentent, et ceci de façon beaucoup plus sensible lors d'un conditionnement spatial que lors d'un apprentissage associatif basé sur l'olfaction.

Ainsi, les différentes fonctions mnésiques ne sont pas altérées de façon similaire au cours du vieillissement. Nos données mettent en évidence que la mémoire à court-terme n'est que peu altérée alors que celle à long-terme est très perturbée chez les animaux sénescents. Enfin, la difficulté de ces derniers à atteindre les critères de réussites fixés, révélée par le nombre d'essais, semble refléter une perturbation de la consolidation des informations acquises au cours même des sessions de d'apprentissage. Ces observations sont en accord avec les celles de Barnes (1979a, 1980), de Geinisman (1995) ou de McEchron et al. (2004) indiquant une perturbation progressive de la capacité des animaux à mémoriser et se rappeler de nouvelles informations au cours du vieillissement.

Selon Schoenbaum et al. (2006), ces altérations résulteraient d'une perte de plasticité et de flexibilité de la mémoire à court terme liée à l'âge. D'ailleurs, Zornetzer et al. (1982) ainsi que Leblanc et Soffie (1999), en utilisant différents paradigmes comportementaux, montrent que l'empan de la mémoire à court terme et de la mémoire de travail, ainsi que la durée de stockage des informations, sont plus courtes chez des rats très âgés que chez des jeunes (Zornetzer et al. 1982; Leblanc et Soffie 1999).

D'autre part, en vieillissant, les animaux ont de plus en plus de difficultés à consolider rapidement les informations acquises lors d'une session (Gallagher et Colombo 1995; Ward et al. 1999; Foster 1999; Kudo et al. 2005). Ce défaut de la capacité à consolider les nouvelles informations pourraient expliquer l'évolution plus lente des rats sénescents jusqu'au critère d'apprentissage que nous constatons, les rats ayant plus de difficultés à tirer un bénéfice de la session précédente. Ainsi, au codage perturbé des informations en situation d'apprentissage s'ajouterait le fait que les animaux font appel à des traces mnésiques incomplètes, voire erronées, résultant de déficits de consolidation au cours des jours précédents. Cette hypothèse se voit renforcée par les résultats d'études mettant en évidence une perturbation des phénomènes de consolidation très marquée chez les animaux âgés (Shen et al. 1997; Tanila et

al. 1997; Rosenzweig et Barnes 2003; Wilson et al. 2004; Burke et Barnes 2006). Ces déficits de consolidation pourraient résulter de différents mécanismes et plusieurs hypothèses sont avancées pour en rendre compte. La plus couramment acceptée propose que les structures impliquées dans l'encodage et le rappel de tels apprentissages sont profondément perturbées par la sénescence. Ainsi, par exemple, les altérations observées dans la consolidation et le rappel de tâches spatiales ont été corrélées avec la diminution de la capacité à induire et maintenir la PLT dans l'hippocampe (Dieguez et Barea-Rodriguez 2004). Le vieillissement s'accompagne également de perturbations de la libération et l'efficacité de nombreux neurotransmetteurs tel que l'acétylcholine (Burk et al. 2002; Sarter et al. 2004). Ce neurotransmetteur serait nécessaire pour permettre aux animaux, non seulement le maintien de l'attention, mais aussi pour la consolidation et le rappel des informations mises en mémoire (Hasselmo 1995, 1999; Sarter et al. 2004). Ainsi, ces divers mécanismes peuvent tous interférer pour rendre compte des altérations des capacités cognitives des rats sénescents; toutefois, nous ne pouvons en privilégier aucun puisque nous n'avons pas abordé cette dimension fonctionnelle qui dépassait le cadre de notre étude.

En conclusion, nos résultats montrent, en accord avec la littérature, une altération des capacités cognitives chez le Rat en fonction de l'âge. Toutefois, celle-ci ne s'exprime pas de façon identique:

- selon les comportements étudiés: le déficit est faible dans le cas d'une reconnaissance d'objets, beaucoup plus important lors d'une tâche spatiale;
- selon les sujets: en effet, nous avons observé une grande variabilité interindividuelle chez les sujets sénescents.

Ce travail souligne donc la prudence avec laquelle il convient d'aborder des expériences, dans le domaine du comportement, menées chez des animaux âgés; en particulier, il met en évidence la nécessité d'évaluer leurs capacités cognitives afin de bien pouvoir interpréter leurs performances lors de test de conditionnement complexe.

III. L'acquisition et le rappel de l'AOPG sont-ils modifiés en fonction de l'âge ?

Dans les tâches comportementales sans renforcement négatif, nous notons des altérations de plus en plus importantes des capacités cognitives des rats au cours du vieillissement. Néanmoins, nous constatons que, quelles que soient leurs perturbations mnésiques dans les tâches précédentes, tous les animaux acquièrent l'AOPG et expriment une aversion pour l'odeur ou le goût conditionnés. De plus, la force de l'aversion vis-à-vis du stimulus gustatif (calculée par le coefficient d'aversion) est similaire quel que soit l'âge des sujets mais celle pour l'odeur tend à augmenter avec l'âge.

Le fait que tous les animaux acquièrent l'AOPG confirme, et complète, les résultats de Hinderliter et Misanin (1993, 1995) et de Misanin et al. (1997, 2002a, b) indiquant que les animaux, même très âgés, peuvent acquérir une aversion gustative.

Le renforcement de l'aversion pour l'odeur en fonction de l'âge pourrait s'expliquer par la nécessité des animaux très âgés à détecter le plus rapidement et efficacement possible toute substance potentiellement dangereuse. En effet, les rats sénescents semblent avoir un métabolisme plus sensible que les jeunes à l'empoisonnement (Gagliese et Melzack 2000). Or, la discrimination olfactive à distance des substances potentiellement nocives pourrait leur éviter des risques très dommageables pour leur organisme. Ce point de vue « écologique » suppose que les animaux sénescents ont une attention très focalisée envers leur environnement. En outre, selon Misanin et al. (2002b), les animaux ont plus de difficultés à éliminer le LiCl, suite à un dysfonctionnement rénal, ce qui prolongerait son action et la rendrait plus intense. Toutefois, cette modification physiologique ne semble pas rendre compte, à elle seule, de la supériorité des rats âgés dans les comportements aversifs. En effet, elle pourrait aussi résulter, dans le cas de l'AGC, d'une sensibilité accrue pour le stimulus conditionnel (Misanin et al. 2002b), mais les mécanismes mis en jeu restent à éclaircir.

D'autre part, Misanin et al. (2002a, b) montrent que l'aversion pour le goût est plus forte chez les animaux sénescents que chez les jeunes dans un protocole d'AGC. Cependant, dans nos conditions expérimentales, l'aversion pour le goût n'évolue pas de façon significative avec l'âge. Cette divergence peut tenir à la nature du phénomène que nous observons, c'est-à-dire

une AOPG versus une AGC. Notons d'ailleurs que peu d'études se sont intéressées à l'évolution des apprentissages aversifs en fonction de l'âge.

Ainsi, bien que divers travaux aient mis en évidence une altération importante des capacités d'encodage et de stockage chez les rats sénescents, ces animaux restent capables d'apprendre et de souvenir de l'AOPG. Nos résultats semblent indiquer que les circuits cérébraux mis en jeu dans ces divers apprentissages ne seraient pas identiques. Le vieillissement n'affecte pas de façon similaire toutes les régions cérébrales, par exemple l'hippocampe est très altéré par la sénescence. Cela pourrait expliquer les différences comportementales que nous observons : les régions cérébrales impliquées dans l'AOPG seraient moins altérées par la sénescence.

Une autre explication possible tiendrait à la nature même des apprentissages auxquels nous avons soumis les animaux. En effet, la discrimination olfactive, ainsi que le retour au gîte, sont des tâches nécessitant une participation active de l'animal et sont basés sur un apprentissage par essais et par erreurs, c'est-à-dire que l'animal comprend la règle du jeu sous-tendant la tâche en faisant des essais successifs et des erreurs. En revanche, dans l'AOPG, les animaux sont passifs et doivent juste apprendre à associer les stimulations conditionnelles à une conséquence post-ingestive. Cette distinction dans les protocoles d'apprentissage pourrait rendre compte, d'une part des différences observées selon les groupes d'âge étudiés, et d'autre part, du fait que tous les rats apprennent une AOPG et s'en souviennent.

En conclusion, notre approche comportementale nous a permis de mettre en évidence une perturbation progressive des capacités d'apprentissage et/ou de rappel lors des différentes tâches. Cependant, ces déficits ne sont pas prédictifs de l'aptitude des animaux à acquérir et à se rappeler l'AOPG. Cela permet de considérer l'AOPG comme un apprentissage original qui semble non seulement échapper aux effets délétères du vieillissement mais même se renforcer avec l'âge.

IV. Impact du vieillissement et du stimulus conditionnel (odeur ou goût) sur les réseaux sous-tendant le rappel de l'AOPG.

IV.1. Effet de l'âge sur l'expression basale de Fos et de Zif268.

Chez les rats C, l'expression de Fos et de Zif268 n'est modifiée par l'âge que dans quelques structures : cortex piriforme antérieur, noyau médian de l'amygdale et région CA1 de l'hippocampe pour Zif268 et cortex piriforme postérieur, amygdale, GD et cortex préfrontal médian pour Fos. Nous observons d'autre part que, dans ces régions cérébrales, si les variations d'expression de Zif268 ne semblent pas en relation avec l'âge des sujets, il n'en est pas de même pour celles notées dans le cas de Fos puisque son expression est toujours significativement plus faible chez les rats sénescents que chez les jeunes. Ainsi, les perturbations de l'expression des gènes précoces immédiats dues au vieillissement diffèrent selon les marqueurs considérés et ne se manifestent que dans un nombre limité de régions cérébrales.

Nos résultats complètent ceux de Lee et al. (1998) qui indiquent une diminution de la quantité d'ARNm de *c-fos* dans le cortex piriforme, le lobe temporal et les champs CA1 et CA3 de l'hippocampe lorsque les animaux sénescents ne sont pas stimulés. Cependant, l'impact réel de la sénescence sur l'expression de *c-fos* reste encore très controversé puisque une autre étude indique que son expression n'est pas diminuée dans les conditions de base (Desjardins et al. 1997).

Peu d'études se sont intéressées à l'expression de *zif268* au cours du vieillissement. Cependant, Desjardins et al. (1997) notent que, dans les conditions de base, celle-ci diminue chez les rats âgés principalement dans le champ CA1 de l'hippocampe. Remarquons que nos résultats, qui portent sur la protéine Zif268, montrent des variations diverses (augmentation ou diminution d'expression) au cours du vieillissement selon les structures.

Nos données apportent donc de nouvelles informations en mettant en évidence des altérations de l'expression des protéines Fos et Zif268 au cours du vieillissement et en précisant que seules certaines régions sont spécifiquement concernées et qu'elles diffèrent selon le marqueur considéré.

IV.2. Effet de l'âge et du stimulus conditionnel présenté lors du rappel de l'AOPG sur l'expression de Fos et de Zif268.

IV.2.a. Régions cérébrales activées uniquement lorsque l'odeur est utilisée pour le rappel de l'AOPG.

L'analyse des motifs d'activation lors du rappel de l'AOPG, laisse apparaître que le cortex piriforme et le cortex insulaire sont toujours activés qu'en présence de l'odeur ayant acquis une valeur aversive; par contre, nous observons une activation plus limitée du cortex entorhinal et du noyau central de l'amygdale en fonction du marqueur considéré, respectivement, respectivement Fos et Zif268.

- **Le cortex piriforme.**

Dans ce cortex, seule la présentation de l'odeur lors du rappel de l'AOPG, induit, chez les rats aversifs, une expression plus marquée de Fos quel que soit leur âge et de Zif268 chez les jeunes et sénescents seulement. Ainsi, cette étude est la première à indiquer que le CP participe au rappel de l'AOPG. Nous pouvons avancer l'hypothèse qu'au niveau de ce cortex qui, outre le traitement sensoriel des informations (Kadohisa et Wilson 2006), participe également à la formation de la mémoire olfactive (Staubli et al. 1987 ; Chaillan et al. 1993 ; Litaudon et al. 1997 ; Datiche et al. 2001; Zinyuk et al. 2001 ; Rouillet et al. 2005 ; Calu et al. 2006), aurait lieu une première analyse du stimulus odorant intégrant sa connotation aversive acquise lors de l'apprentissage de l'AOPG. Nos résultats peuvent être rapprochés de ceux de Sevelinges et al. (2004) qui montrent, chez le Rat, une excitabilité plus élevée du CP postérieur en réponse à l'odeur devenue apeurante par conditionnement.

En résumé, nos données étayent l'hypothèse d'un rôle du CP dans le traitement mnésique de l'information olfactive.

- **Le cortex entorhinal.**

Dans le CE, l'expression de Fos est modifiée par la présentation de l'odeur chez les jeunes rats et les sénescents mais aucun changement de celle Zif268 n'est observé. Son activation pourrait refléter celle observée dans le CP, dont il reçoit de très nombreuses afférences, et indiquer, pour ce cortex, un simple rôle de relais entre le CP et l'hippocampe pour les informations olfactives de l'AOPG. Toutefois, comme nous l'avons signalé dans

l'introduction, cette structure a un rôle complexe dans les apprentissages mettant en jeu l'olfaction puisque sa lésion facilite l'apprentissage des tâches de reconnaissance olfactive et l'acquisition de l'AOC (Ferry et al. 1996, 2006 ; Wirth et al. 1998). En fait, via ses projections GABAergiques, le CE modulerait l'activité des régions qui lui sont connectées (Ferry et Di Scala 1999, Bernabeu et al. 2006) et participerait ainsi à la formation de la mémoire olfactive. Toutefois, d'après nos résultats, le CE n'aurait pas qu'un rôle de modulation d'autres régions cérébrales, il semble, outre sa fonction de relais de l'information olfactive avant que celle-ci ne gagne l'hippocampe, pouvoir participer effectivement au traitement même de l'information olfactive lors du rappel

Cependant, une autre hypothèse pourrait rendre compte de l'activation du CE chez les animaux sénescents. En effet, le vieillissement altère peu la structure histologique et les propriétés physico-chimiques du CE (Merill et al. 2001) mais détériore beaucoup la voie perforante qui relie le CE et le GD (Smith et al. 2000). Ainsi, chez les animaux les plus âgés, la transmission de l'information olfactive entre le CE et le GD ne se faisant plus correctement, pourrait induire une activation de cette région lors de la stimulation olfactive. Soulignons d'ailleurs que, chez les adultes, ce n'est pas le CE qui est spécifiquement activé lors du rappel de l'AOPG par l'odeur mais le GD.

- **Le cortex insulaire.**

Dans cette structure, nous notons une différence significative entre les rats aversifs et non aversifs lors du rappel de l'AOPG par l'odeur seule dans les trois groupes d'âge étudiés pour l'expression de Fos, mais seulement chez les jeunes et les adultes pour celle de Zif268. De plus, quel que soit le marqueur considéré, le pourcentage de variation entre les animaux aversifs et non aversifs est moins fort chez les jeunes que chez les adultes, indiquant, chez ces derniers, un recrutement plus important de ce cortex lors du rappel de l'aversion. Ainsi, le cortex insulaire participe au rappel de l'AOPG en présence de l'odeur. Or, bien que ce cortex soit nécessaire pour l'acquisition de l'AOPG (Lasiter et al 1985b, Sakaï et Yamamoto, 2001), la lésion du CI ne perturbe pas son rappel en présence de l'odeur ou du goût (Kiefer et al. 1982). Toutefois, ces différences entre les résultats peuvent être liées aux protocoles utilisés (lésion versus immunohistochimie) pour analyser le rôle de ce cortex dans l'AOPG.

Dans nos conditions expérimentales, son rôle pourrait tenir aux connexions qu'il entretient avec d'autres régions cérébrales. En effet le CI reçoit des informations de diverses

modalités: olfactive, via ses connexions avec le CP (Datiche et Cattarelli 1996), et viscérale, via celles avec les noyaux du tronc cérébral (Sewards et Sowards 2001). En plus de ces afférences, le cortex insulaire est en relation avec l'amygdale, le cortex entorhinal et des régions frontales (McDonald 1998, Pitkänen 2000, Sowards et Sowards 2001). Ainsi, ces données permettent de considérer cette région comme un centre d'intégration qui reçoit des informations sensorielles variées et qui, en plus de son rôle de cortex gustatif, permettrait l'élaboration d'une « image » ou représentation multi-sensorielle du stimulus qui serait transmise vers des régions cérébrales plus centrales impliquées dans la mémoire et le comportement (Bielavska et Roldan 1996 ; Escobar et Bermúdez-Rattoni, 2000). C'est de cette intégration multi-sensorielle que pourrait résulter l'activation du CI que nous observons lors du rappel de l'AOPG en présence de l'odeur.

Dans notre paradigme expérimental, nous remarquons également que le cortex insulaire présente un profil d'expression de Fos particulier chez les rats sénescents. En effet, à cet âge, les animaux Na-O sont significativement plus marqués que les Li-O. Cette différence reste difficile à expliquer et semblerait indiquer que, chez les animaux très âgés, ce cortex serait moins sollicité lors du rappel de l'AOPG. Etant donné que le coefficient d'aversion augmente en fonction de l'âge, nous pouvons aussi avancer l'hypothèse que, chez les animaux sénescents, une altération du fonctionnement du CI pourrait conduire à une moins bonne adaptation de la réponse comportementale et, donc à une exagération de cette dernière. En plus de cette altération du CI, on peut également supposer que, suite au vieillissement, les connexions entre le CI et le CP pourraient être modifiées.

Nous pouvons aussi noter que, lors du rappel en présence du goût, nous n'observons pas de différence significative entre les rats aversifs et les témoins Na. Ainsi, dans le CI, deux processus pourraient coexister: d'une part, l'implication de ce cortex dans le rappel de l'AOPG et, d'autre part, le traitement sensoriel cortical des informations gustatives proprement dit (Yamamoto et al. 1984b). Le premier rendrait compte du marquage non négligeable observé chez les rats Li-G; le second prédominerait chez les Na-G, qui consomment une plus grande quantité de solution de saccharine que les animaux aversifs, et serait à l'origine de la forte expression des deux protéines Fos et Zif268 constatée.

- **Le noyau central de l'amygdale.**

Dans cette région seule l'expression de Zif268 est modifiée par la présentation de l'odeur. De plus, nous ne l'observons que chez les rats jeunes et adultes. Ce noyau reçoit des informations olfactives et viscérales et pourrait être impliqué dans la perception de la nociception (Tanimoto et al. 2003), la détection d'un goût nouveau (Koh et al. 2003) et le comportement alimentaire (Huang et al. 2003). Ces études ne sont pas incompatibles avec nos résultats; toutefois, son rôle dans l'AOPG reste encore très documenté à ce jour.

En résumé, le cortex piriforme, le cortex entorhinal et le cortex insulaire sont impliqués dans le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur. Ces régions, qui diffèrent par leurs connexions, leurs anatomies (paléocortex versus néocortex) et leurs fonctions (traitement olfactif versus traitement gustatif), serviraient de "porte d'entrée" aux signaux olfactifs et permettraient leur transmission vers des régions plus centrales.

IV.2.b. Régions cérébrales activées par l'odeur et par le goût lors du rappel de l'AOPG.

- **Le noyau basolatéral de l'amygdale**

Quel que soit l'âge, le noyau basolatéral de l'amygdale présente toujours un marquage Fos ou Zif268 significativement plus élevé chez les rats aversifs Li que chez les témoins Na lors du rappel de l'AOPG par l'odeur ou par le goût. De plus, comme l'indique le pourcentage de variation du marquage, cette activation se renforce avec l'âge. Ainsi, nous mettons en évidence, pour la première fois, une implication du BLA dans le rappel de l'AOPG. Enfin, nous notons que, chez les jeunes rats, ce noyau montre une activation sélective selon le stimulus utilisé pour induire le rappel: elle est plus forte en présence de l'odeur que du goût.

Des études, utilisant des lésions pharmacologiques ou chirurgicales, montrent que le BLA, est nécessaire pour l'acquisition et le rappel de l'AGC (Lamprecht et Dudai 1996 ; Bermúdez-Rattoni et Yamamoto 1998 ; Miranda et al. 2003 ; Yasoshima et al. 2006). Il l'est aussi pour l'acquisition de l'AOPG (Bermúdez-Rattoni et al. 1986 ; Hatfield et al. 1992) mais

son inactivation pharmacologique ne perturbe pas son rappel (Ferry et al. 1995). Cette divergence par rapport à nos résultats pourrait être liée aux méthodes utilisées pour étudier les substrats neuro-anatomiques de l'AOPG. En effet, notre étude préserve le fonctionnement de l'amygdale et montre que le BLA participe au rappel en présence de l'odeur ayant acquis une valeur aversive. On ne peut également exclure qu'après lésion du BLA puisse se mettre en place une compensation de son activité par une autre région cérébrale (White et McDonald 2002). Ainsi, dans nos conditions expérimentales, nous pouvons conclure à une participation du BLA dans le rappel de l'AOPG.

On sait que le BLA participe à l'établissement des aversions (Lamprecht et Dudai 2000) et des préférences pour des saveurs (Gilbert et al. 2003 ; Touzani et Scalfani 2005). En effet, centre d'intégration des informations sensorielles, il participerait également à l'élaboration des réponses comportementales en modulant l'activité d'autres régions cérébrales centrales. Ainsi, ce noyau semble occuper une place centrale dans la gestion des comportements mettant en jeu des émotions, généralement négatives, (Ledoux 2001 ; McGaugh 2004). Ce rôle de « gestionnaire des émotions » résulterait de ces afférences provenant de multiples modalités sensorielles (olfactive, viscérale, somesthésique) ou de régions impliquées dans les phénomènes de mémorisation et de rappel (Pitkanen 2000). En effet, le BLA entretient une collaboration étroite avec l'hippocampe (Bielavska et Roldan 1996 ; Akirav et Richter-Levin 2002 ; Almaguer et al. 2002) et le cortex orbito-frontal (Schoenbaum et al. 1999 ; Schoenbaum et al. 2000 ; Saddoris et al. 2005) et modulerait, via son activité, la consolidation de différents types d'apprentissage (aversion, peur conditionnée,...) (McGaugh 2002 ; Packard et Wingard 2004). Dans le contexte du rappel de l'AOPG, le BLA pourrait ainsi intégrer les dimensions sensorielles et émotionnelles de la stimulation et moduler l'activité de l'hippocampe et des régions néocorticales pour conduire à l'évitement du signal aversif.

Dans le BLA, nous constatons qu'en présence de l'odeur ou du goût, le pourcentage de variation de marquage entre les rats Li et les Na augmente pour Fos entre les trois âges et pour Zif268 entre les jeunes et les adultes. Toutefois, une différence apparaît entre ces deux gènes précoces immédiats chez les rats sénescents. En effet, chez ces derniers, le pourcentage diminue pour Zif 268 lors du rappel en présence de l'odeur, ce qui pourrait être imputable à une perturbation, dans ce noyau, de l'expression de ce gène au cours du vieillissement, même si aucune étude, à notre connaissance, ne vient étayer cette hypothèse. Au contraire, en ce qui concerne Fos, son pourcentage de variation augmente chez les sénescents. Or, chez ces rats,

nous avons observé, dans ce noyau amygdalien, une moindre expression de Fos dans les conditions de base (rats C). Il apparaît donc que l'expression de la protéine Fos diffère selon les conditions expérimentales: faible chez les sujets contrôles, elle n'en est pas moins importante lors du rappel de l'AOPG. Cette observation peut être rapprochée de résultats montrant que l'expression de base de l'ARNm *c-fos* peut diminuer au cours du vieillissement sans que cette perturbation ne soit corrélée avec le niveau des performances comportementales des rats (Lanahan et al. 1997 ; Boguzewski et Zagrodzka 2005). Ainsi, et en fonction des conditions environnementales, une expression différentielle du gène précoce immédiat *c-fos* semble se mettre en place au cours du vieillissement.

- **Le noyau médian de l'amygdale.**

Dans le Med, la présentation de l'odeur lors du rappel de l'AOPG induit une expression accrue de Fos chez les rats sénescents et de Zif268 chez les jeunes tandis que la stimulation gustative n'augmente l'expression de Zif268 que chez les adultes. Il semble donc difficile de conclure sur le rôle que pourraient avoir le Med dans le rappel de l'AOPG. Ce noyau amygdalien est principalement en relation avec des structures olfactives (Mc Donald 1998 ; Pitkanen 2000). Il serait impliqué dans la reconnaissance de l'odeur de prédateur (Day et al. 2004 ; Müller et Fendt 2004) et dans l'acquisition d'une AOC (Schettino et Otto 2001). Ainsi, bien que ce noyau puisse participer à l'acquisition des aversions mettant en jeu des odeurs, son rôle précis dans le rappel de tels apprentissages reste inconnu.

- **L'hippocampe.**

Dans cette structure, nos résultats indiquent que les expressions de Fos et de Zif268 évoluent différemment selon la nature du stimulus et l'âge étudié.

Lors du rappel en présence de l'odeur, l'expression de Fos est accrue dans les champs CA1 et CA3, chez les rats jeunes et les adultes mais pas chez les sénescents, ainsi que dans le GD mais uniquement chez les adultes. Par contre, l'expression de Zif268 n'est jamais modifiée. Lors du rappel en présence du goût, seule l'expression de Fos augmente chez les jeunes dans les champs CA1 et CA3. Chez les adultes, les marquages Fos et Zif268 ne sont accrus que dans CA1. Il semble donc que les champs CA1 et CA3 participent au rappel de l'AOPG chez les rats jeunes et les adultes.

Le rôle de l'hippocampe dans les apprentissages aversifs semble complexe. En effet, sa lésion empêche les animaux d'acquiescer une AOC (Miller et al. 1986) ou une aversion au contexte (Aguado et al. 1998). D'autre part, son inactivation facilite l'acquisition d'une AGC (Stone et al. 2005). Enfin, la modulation de l'activité cholinergique de cette structure par des agents pharmacologiques perturbe l'acquisition de l'AOPG: alors que l'augmentation de cette activité interrompt l'acquisition de l'AOPG, sa diminution induit une aversion plus prononcée (Bermúdez-Rattoni et al. 1987). Ainsi, les données issues de la littérature semblent indiquer une participation de l'hippocampe dans l'acquisition de l'aversion, sans toutefois définir un rôle précis pour cette structure. De plus, bien que participant à ce type d'apprentissage, cette région ne semble pas être directement impliquée dans son rappel. Le rôle de l'hippocampe dans les apprentissages aversifs pourrait résulter de sa fonction dans le codage rapide d'expériences acquises en une fois (Nakazawa et al. 2003). De plus, l'hippocampe est impliqué dans la formation des mémoires de travail et à long-terme (Zola-Morgan et Squire 1986). Cependant, malgré ces nombreuses études, le rôle précis de cette région dans les processus mnésiques n'est pas encore complètement élucidé.

Dans le cadre du rappel de l'AOPG, l'activation des champs CA1 et CA3 n'est peut être pas directement liée à la signification aversive du stimulus olfactif mais au rappel au sens large, c'est-à-dire à l'attention que les animaux doivent accorder à la stimulation olfactive ou au contexte dans lequel a lieu le rappel. En effet, après lésion de l'hippocampe, des rats ont des difficultés à maintenir leur attention pendant un conditionnement classique (Clark et Squire 1998). Cependant, l'activation que nous observons pourrait également résulter de la reconnaissance du contexte lors du rappel de l'AOPG. En effet, l'hippocampe semble impliqué dans ce type de reconnaissance puisque sa lésion supprime, chez le rat, l'aversion, préalablement apprise, vis-à-vis d'un contexte particulier (Phillips et Ledoux 1992).

Le rôle de l'hippocampe dans le rappel de l'AOPG pourrait résulter de ces différents aspects fonctionnels que nous avons mentionnés, toutefois, nous ne pouvons, à ce jour, trancher entre ces hypothèses et déterminer avec plus de précision les fonctions des champs CA1 et CA3 en présence de l'odeur.

Chez les animaux sénescents, par contre, nos données montrent que les champs CA1 et CA3 de l'hippocampe ne sont pas activés lors du rappel de l'AOPG. L'absence de différence significative entre les rats aversifs et les témoins peut tenir aux perturbations fonctionnelles que subit cette région au cours du vieillissement. Comme nous l'avons rappelé dans

l'introduction, l'hippocampe est la région dont le fonctionnement est le plus perturbé par la sénescence (Burk et Barnes 2006). D'autre part, lorsque l'hippocampe n'est plus fonctionnel, nous observons que la force de l'aversion envers le stimulus olfactif se renforce. Or, une étude montre que l'inactivation de l'hippocampe par application de muscimol améliore fortement l'acquisition d'une AGC (Stone et al 2005). Il pourrait en être de même dans le cas de l'AOPG et ceci rendrait compte des meilleures performances des rats sénescents que nous constatons. Par contre, lorsque l'hippocampe est normalement fonctionnel chez les rats jeunes et les adultes, l'acquisition de l'AOPG, et par conséquent son rappel, seraient mieux régulés, ce que traduit le coefficient d'aversion pour l'odeur lors du rappel de l'AOPG dans ces deux groupes d'âge.

En ce qui concerne le GD, nos résultats montrent que seule l'odeur suscite une expression accrue de Fos lors du rappel de l'AOPG uniquement chez les rats adultes. Or, à cet âge, le CE n'est pas activé. Ces deux structures sont interconnectées via la voie perforante qui constitue la principale voie d'accès des informations à la région hippocampique. Ces résultats pourraient être le reflet de la dimension temporelle du transfert et du traitement des informations entre ces deux structures.

- **Les cortex orbito-frontal et préfrontal médian.**

Les résultats obtenus lors du rappel de l'AOPG sont relativement complexes. En effet, la cartographie révèle, pour l'expression de Fos, que ces deux régions sont activées chez les rats jeunes en présence de l'odeur ou du goût. En revanche, et uniquement lors du rappel par l'odeur, seuls sont activés le cortex orbito-frontal chez les adultes et le cortex préfrontal médian chez les sénescents. L'expression de Zif268 est accrue dans le COF en présence de l'odeur chez les jeunes et en présence du goût chez les adultes.

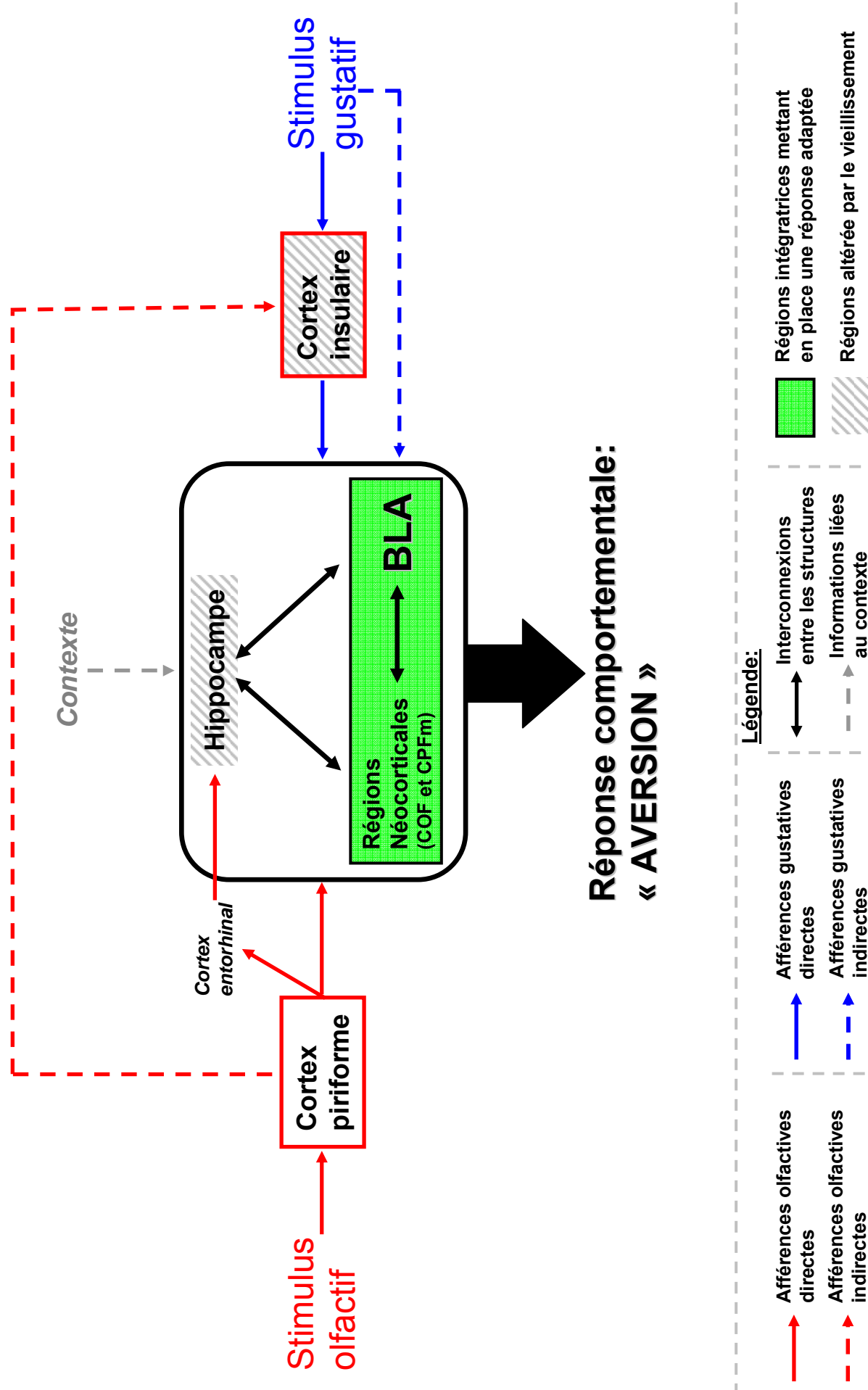
Ainsi, dans nos conditions expérimentales, les aires néocorticales orbito-frontale ou préfrontale médiane sont préférentiellement mises en jeu dans le rappel de l'AOPG, lorsque celui-ci est induit par l'odeur; et c'est la première fois que leur implication dans ce phénomène est décrite. D'après la littérature, ces structures ne participent pas à l'acquisition de l'AOPG (Lasiter et al. 1985b). Nos résultats concordent avec ceux issus d'une étude d'imagerie fonctionnelle qui mettent en évidence une activation de ces structures lors de la présentation de stimuli aversifs chez l'Homme (Nitschke et al. 2006). On sait que ces régions néocorticales reçoivent des afférences olfactives (Sesack et al. 1989 ; Datiche et Cattarelli

1996 ; Johnson et al. 2000), gustatives (Ongür et Price 2000 ; Rolls 2001) et somesthésiques (Vertés 2004). Cette convergence de messages sensoriels conduit à considérer ces régions, et le COF en particulier, comme ayant une fonction d'intégration mais aussi de tri ("gating") des informations (Rolls 2001). De plus, ces régions sont aussi en relation avec l'amygdale et l'hippocampe (Schoenbaum 1999 ; Cardinal et al. 2002 ; Vertés 2006). Cette collaboration entre ces trois régions participe à l'intégration des informations, à l'apprentissage et au rappel de différents comportements ainsi qu'à la prise de décision pour élaborer une réponse adaptée à la situation (Cardinal et 2002 ; Schoenbaum et al. 2003). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le COF et le CPFm seraient responsables de l'élaboration de la réponse comportementale d'aversion observée lors du rappel de l'AOPG: immobilité, inhibition vis-à-vis du biberon, refus de boire.

Remarquons enfin que, chez les rats sénescents, le COF n'est plus activé, alors que le CPFm le devient. Ceci pourrait refléter les altérations que subit le COF au cours du vieillissement. En effet, chez les animaux âgés, l'activité cholinergique est perturbée dans ce cortex, induisant des déficits de la consolidation mnésique (Decker 1987 ; Decker et McGaugh 1991). De plus, la flexibilité de l'activité neuronale des neurones du COF diminue avec l'âge, réduisant ainsi les capacités d'apprentissage des animaux (Schoenbaum et al., 2006). En revanche, le CPFm ne semble que peu altéré au cours du vieillissement et, lors du rappel de l'AOPG, il pourrait donc, chez les rats sénescents, relayer le COF donc l'activité devient, semble-t-il, déficiente.

Ainsi, ces cortex frontaux, lieu d'intégration plurisensorielle et impliqués dans la prise de décision, interviennent, d'après nos données, dans le rappel de l'AOPG. Cette participation, complexe, met sans doute en jeu de nombreux mécanismes régulateurs.

Figure 46: Modèle de réseau cérébral sous-tendant le rappel de l'aversion olfactive potentialisée par le goût.



V. Vers un modèle de réseau sous-tendant le rappel de l'AOPG.

Comme nous l'avons souligné dans l'introduction et cette discussion, certaines études fonctionnelles montrent que l'hippocampe, le noyau basolatéral, le cortex insulaire et les régions frontales sont impliqués dans l'acquisition de l'AOPG.

Toutefois, à ce jour, peu de travaux se sont intéressés au rappel de l'AOPG et les régions cérébrales impliquées dans ce phénomène restaient encore peu connues. Par notre approche, basée sur la détection de Fos et Zif268, nous avons mis en évidence des réseaux activés par l'odeur ou le goût qui ont préalablement acquis une valeur aversive. A partir de ces données, nous pouvons esquisser un modèle de réseau cérébral sous-tendant le rappel de l'AOPG. Nous avons divisé celui-ci en deux sous-réseaux : le premier est un réseau « sensoriel » et correspond à un ensemble de structures qui reçoivent les informations sensorielles et les traitent. Le second, le réseau « fonctionnel », permet d'intégrer, à la dimension sensorielle du stimulus, sa signification préalablement apprise, et d'élaborer ainsi une réponse comportementale adaptée. Ce modèle est présenté sous forme schématique dans la figure 46.

Remarquons que notre modèle ne prend en compte que les résultats les plus significatifs de nos expériences. Toutefois, nous ne pouvons exclure que des régions non étudiées dans ce travail participent, elles aussi, au rappel de l'AOPG.

V.1. Le sous-réseau « sensoriel ».

Ce premier sous-réseau est constitué par le cortex piriforme, le cortex entorhinal et le cortex insulaire.

Le CP permettrait d'intégrer la dimension sensorielle du stimulus olfactif. En effet, il permet d'identifier les messages arrivant du bulbe olfactif, de les coder en fonction de leurs qualités et de leurs intensités puis de les intégrer dans un traitement mnésique, sans doute par comparaison avec des informations stockées précédemment, avant de les transmettre vers d'autres régions cérébrales. Le cortex entorhinal, faisant partie du cortex olfactif primaire, reçoit ces informations émises par le cortex piriforme et les transmet à l'hippocampe via le gyrus denté.

Le cortex insulaire reçoit les informations émanant du cortex piriforme mais aussi celles d'autres régions traitant des modalités sensorielles différentes. Malgré nos données, on ne peut exclure le fait que le cortex insulaire reçoit et traite les informations gustatives lors du rappel de l'AOPG, bien que, dans notre cadre expérimental, cette activation puisse être masquée par le simple traitement sensoriel de la stimulation gustative. De plus, on peut supposer que les informations pourraient être acheminées indirectement par d'autres relais gustatifs.

Ces régions envoient ensuite les informations vers d'autres structures plus centrales, les renseignant ainsi sur les stimulations perçues. Nous avons regroupé ces dernières dans le second sous-réseau.

V.2. Le « sous-réseau fonctionnel » : intégration des stimuli et élaboration de la réponse aversive

Nous avons choisi de placer dans ce second sous-réseau : les régions néocorticales orbito-frontale et préfrontale médiane, le noyau basolatéral de l'amygdale et l'hippocampe.

Ce réseau va intégrer les informations sensorielles reçues, les comparer avec la trace mnésique stockée lors de l'acquisition et élaborer une réponse comportementale adaptée.

En effet, les cortex orbito-frontal et préfrontal médian et le BLA, recevant les informations issues des cortex piriforme et insulaire, permettent leur comparaison avec les informations stockées dans le cerveau.

Le BLA intègre également à ces informations une dimension émotionnelle et module, en retour, l'activité des régions néocorticales via ses efférences, ce qui permettra l'élaboration, la programmation et la mise en œuvre d'une réponse comportementale adaptée c'est-à-dire, dans nos conditions expérimentales, le rejet des stimuli conditionnés et donc l'inhibition de la consommation hydrique.

Enfin, l'hippocampe reçoit des informations venant des régions impliquées dans le traitement sensoriel via le cortex entorhinal. Selon Dudai (2002), l'hippocampe constituerait un index mental qui permet de comparer le stimulus auquel est soumis l'animal avec des "fiches de références" créées lors de l'acquisition de l'AOPG. Cependant, bien que cette

région puisse contribuer au comportement d'aversion elle ne semble toutefois pas indispensable car même lorsqu'elle n'est plus activée (comme chez les rats sénescents, par exemple) les animaux restent capables d'acquérir et de se rappeler l'AOPG.

Ce modèle tient également compte du fait que le rappel de l'AOPG en présence de l'odeur entraîne l'activation d'un nombre de structures plus important que celui en présence du goût. Ce circuit cérébral plus vaste induit par la stimulation olfactive serait le résultat de la potentialisation de l'odeur par le goût. Ainsi, par ce phénomène, l'odeur accéderait à une représentation plus vaste et redondante dans le cerveau du Rat alors que celle du goût ne resterait limitée qu'à quelques régions

Conclusion et perspectives.

Au cours de ce travail, nous avons cherché à mieux comprendre l'implication de certaines régions cérébrales lors du rappel de l'aversion olfactive potentialisée par le goût et cela, en fonction de l'âge des sujets. Dans cette perspective, notre étude s'est composée d'une approche comportementale suivie d'une analyse neuro-anatomo-fonctionnelle.

La première nous a permis de mettre en évidence une évolution des capacités mnésiques lors de la sénescence chez le Rat. Nos observations ont révélé que, lors du vieillissement, la mémoire à court-terme était peu perturbée alors que celle à long-terme et la capacité à consolider un apprentissage étaient, elles, plus ou moins modifiées selon la tâche. Toutefois, même si les rats ne présentent pas tous des altérations cognitives identiques, ils demeurent tous capables d'apprendre et de se rappeler une AOPG. De plus, avec l'âge, la force de l'aversion envers le stimulus olfactif se renforce. Ainsi, nous avons mis en évidence que les déficits cognitifs des animaux ne sont pas prédictifs de leurs performances lors de l'AOPG et que cet apprentissage échappe aux perturbations mnésiques liées à la sénescence.

Dans la seconde partie, par la cartographie de l'expression des protéines Fos et Zif268, nous avons montré qu'il existe un ensemble de structures cérébrales qui s'activent lors du rappel de l'AOPG. Nous avons noté qu'il pouvait se regrouper en deux sous-réseaux, permettant l'un, l'intégration du stimulus sensoriel, et l'autre, l'élaboration de la réponse comportementale d'aversion. Cette étude a ainsi souligné le rôle du cortex piriforme et du cortex insulaire dans le tri et le traitement des informations sensorielles, alors que le BLA, les régions néocorticales et l'hippocampe, permettraient l'intégration de ces informations et conduirait à la genèse du comportement d'aversion. Toutefois, ce réseau ne reste pas figé et évolue de façon dynamique en fonction de l'âge des animaux jusqu'à se réduire en un réseau minimal. Un de nos résultats le plus intéressant est que le noyau basolatéral participe au rappel de l'AOPG quel que soit l'âge ou le stimulus présenté. L'ensemble de ces données nous a permis d'élaborer un modèle de réseau cérébral pouvant sous-tendre le rappel de l'AOPG.

Ce travail constitue une première étape dans la démarche vers une compréhension plus complète des phénomènes centraux impliqués dans le rappel de l'AOPG. En effet, à l'avenir, les travaux futurs devront s'attacher à préciser plus finement le rôle des régions dont nous avons mis en évidence l'implication dans le rappel de l'AOPG, et permettront ainsi de compléter le modèle proposé dans cette thèse. Pour cela, des approches associant comportement et biologie moléculaire pourraient être envisagées telles que le blocage de l'activité Fos et/ou Zif268 par l'injection d'oligonucléotides spécifiques ou l'utilisation d'interférences ARN. Des enregistrements électrophysiologiques en chronique, chez le sujet se comportant, permettraient de caractériser les réponses de ces structures et les interactions qui pourraient exister dans ce réseau cérébral lors du rappel de l'AOPG.

Ainsi, ces approches futures permettront de mieux appréhender comment l'odeur et le goût interagissent au niveau central et comment ces informations influencent nos comportements.



REFERENCES

-A-

Abraham W.C., Dragunow M. et Tate W.P. (1991). The role of immediate early genes in the stabilization of long-term potentiation. *Mol. Neurobiol.* 5(2-4): 297-314.

Abraham W.C., Mason S.E., Demmer J., Williams J.M., Richardson C.L., Tate W.P., Lawlor P.A. et Dragunow M. (1993). Correlations between immediate early gene induction and the persistence of long-term potentiation. *Neurosci.* 56 (3): 717-727.

Adolph R., Tranel D., Hamann S., Young A.W., Calder A.J., Phelps E.A., Anderson A., Lee G.P. et Damasio A.R. (1999). Recognition of facial emotion in nine individuals with bilateral amygdala damages. *Neuropsychologica* 37: 1111-1117.

Aguado L., Hall J., Harrington N. et Symonds M. (1998). Illness-induced context aversion learning in rats with lesions of the dorsal hippocampus. *Behav. Neurosci.* 112(5) : 1142-1151.

Akirav I. et Richter-Levin G. (2002). Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. *J. Neurosci.* 22 : 9912-9921.

Akirav I., Khatsrinov V., Vouimba R.M., Merhav M., Ferreira G., Rosenblum K. et Maroun M. (2006). Extinction of conditioned taste aversion depends on functional protein synthesis but not on NMDA receptor activation in the ventromedial prefrontal cortex. *Learn. Mem.* 13(3): 254-258.

Allen G.V., Saper C.B., Hurley K.M. et Cechetto D.F. (1991). Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 311(1): 1-16.

Almaguer W., Estupinan B., Uwe Frey, J. et Bergado J.A. (2002). Aging impairs amygdala-hippocampus interactions involved in hippocampal LTP. *Neurobiol. Aging* 23(2): 319-324.

Amaral D.G. et Witter M.P. (1995). Hippocampal formation. In *The Rat Nervous System*, Ed G. Paxinos, Academic Press: NY.

Andrews J.S. (1996). Possible confounding influence of strain, age and gender on cognitive performance in rats. *Cogn. Brain Res.* 3(3-4) :251-267.

Anokhin K.V. et Rose S.P. (1991). Learning-induced Increase of Immediate Early Gene Messenger RNA in the Chick Forebrain. *Eur. J. Neurosci.* 3(2): 162-167.

Apfelbach R. et Weiler E. (1991) Sensitivity to odors in Wistar rats is reduced after low-level formaldehyde-gas exposure. *Naturwissenschaften* 78(5): 221-223.

Astur R.S., Klein R.L., Numby D.G., Protz D.K., Sutherland R.J. et Martin G.M. (2002) A role for olfaction in object recognition by normal and hippocampus-damaged rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 78: 186-191.

-B-

Bahar A., Samuel A., Hazvi S. et Dudai Y. (2003). The amygdala circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *Eur. J. of Neuroscience* 17 : 1527-1530.
Barnes 2003

Barnes C.A. (1979a). Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93(1): 74-104.

- Barnes C.A. et McNaughton B.L.** (1979b) Neurophysiological comparison of dendritic cable properties in adolescent, middle-aged, and senescent rats. *Exp. Aging Res.* 5(3):195-206.
- Barnes C.A., Nadel L. et Honig W.K.** (1980a). Spatial memory deficit in senescent rats. *Can. J. Psychol.* 34(1): 29-39.
- Barnes C.A. et McNaughton B.L.** (1980b). Physiological compensation for loss of afferent synapses in rat hippocampal granule cells during senescence. *J. Physiol.* 309: 473-485.
- Barnes C.A., Rao G. et McNaughton B.L.** (1987). Increased electrotonic coupling in aged rat hippocampus: a possible mechanism for cellular excitability changes. *J. Comp. Neurol.* 259(4): 549-558.
- Barnes C.A., McNaughton B.L., Mizumori S.J., Leonard B.W. et Lin L.H.** (1990). Comparison of spatial and temporal characteristics of neuronal activity in sequential stages of hippocampal processing. *Prog. Brain Res.* 83: 287-300.
- Barnes C.A., Suster M.S., Shen J. et McNaughton B.L.** (1997). Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature* 388: 17-23.
- Batsell W. et Batson J.D.** (1999). Augmentation of taste conditioning by a preconditioned odor. *J. of Exp. Psychobiol.: Animal Behav. Processes* 25(3) : 374- 388.
- Barnes C.A., Rao G. et Houston F.P.** (2000). LTP induction threshold change in old rats at the perforant path granule cell synapse. *Neurobiol. Aging* 21: 613-620.
- Batsell W.R. et Best M.R.** (1993) One bottle too many ? Method of testing determines the detection of overshadowing and retention of taste aversions. *An. Learn. Behav.* 21(2): 154-158.
- Beckmann A.M. et Wilce P.A.** (1997). Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochem. International* 31(4) : 477-510.
- Beckstead R.M.** (1978). Afferent connections of the entorhinal area in the rat as demonstrated by retrograde cell labelling with horseradish peroxidase. *Brain Res.* 152: 249-264.
- Bermúdez-Rattoni F., Grijalva C.V., Kiefer S.W. et Garcia, J.** (1986). Flavor-illness aversions: the role of amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiol. Behav.* 38 : 503-508.
- Bermúdez-Rattoni F., Coburn K.L., Fernandez J., Chavez A.F. et Garcia J.** (1987). Potentiation of odor by taste and odor aversions in rats are regulated by cholinergic activity of dorsal hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26(3): 553-559.
- Bermúdez-Rattoni F. et Yamamoto T.** (1998). Neuroanatomy of CTA: lesions studies. In *Conditioned Taste Aversion – Memory of a special kind*. Ed.: J. Bures, F. Bermúdez-Rattoni and T. Yamamoto. Oxford Psychology Series No. 31, p 28-44. Oxford University Press, New York.
- Bernàbeu R., Thiriet N., Zwiller J. et Di Scala G.** (2006). Lesion of the lateral entorhinal cortex amplifies odor-induced expression of *c-fos*, *junB* and *zif268* mRNA in rat brain. *Synapse* 59: 135-143.
- Bernstein I. L.** (1991). Flavor Aversion. In *Smell and Taste in Health and Disease*. Ed. Getchell T.V., Raven Press : NY.
- Bernstein I.L.** (1999). Taste aversion learning a contemporary perspective. *Nutrition, Immunology, Neuroscience, and Behavior* 15(3) : 229-234.
- Bessa J.M., Oliveira M., Cerqueira J.J., Almeida O.F.X. et Sousa N.** (2005). Age-related qualitative shift in emotional behaviour: paradoxical findings after re-exposure of rats in elevated plus maze. *Behav. Brain Res.* 162: 135-142.

- Bielavska E. et Roldan G.** (1996). Ipsilateral connections between the gustatory cortex, amygdala and parabrachial nucleus are necessary for acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural Brain Research* 81(1-2): 25-31.
- Bliss T.V. et Lomo T.** (1973). Long lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of perforant path. *J. Physiol.* 232: 331-356.
- Bliss T.V. et Collingridge G.L.** (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407): 31-39.
- Blomquist A.J. et Antem A.** (1967). Gustatory deficits produced by medullary lesions in the white rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 63(3): 439-443.
- Boguszewski P. et Zagrodzka J.** (2002). Emotional changes related to age in rats—a behavioral analysis. *Behav. Brain Res.* 133(2) : 323-332.
- Boguszewski P. et Zagrodzka J.** (2005). Expression of c-Fos in response to stressogenic stimuli in the amygdala of old vs. young rats – a preliminary study. *Acta Neurobiologicae Experimentalis* 65: 191-194.
- Boujabit M.B., Bontempi B., Destrade B. et Gisquet-Verrier P.** (2003). Exposure to a retrieval cue in rats induces changes in regional brain glucose metabolism in the amygdala and other related brain structures. *Neurobiol. of Learn. and Mem.* 79(1) : 57-71.
- Bouton M.E., Jones D.L., McPhillips S.A. et Swartzentruber D.** (1986). Potentiation and overshadowing in odor-aversion learning: Role of method of odor presentation, the distal-proximal cue distinction, and the conditionability of odor. *Learn. and Motiv.* 17: 115–138.
- Bozon B., Davis S. et Laroche S.** (2002) Regulated transcription of the immediate-early gene *Zif268*: mechanisms and gene dosage-dependent function in synaptic plasticity and memory formation. *Hippocampus* 12: 570-577.
- Bozon B., Davis S. et Laroche S.** (2003) A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* 40(4): 695- 701.
- Brandner C. et Schenk F.** (1998) Septal lesions impair the acquisition of a cued place navigation task: attentional or memory deficit? *Neurobiol. Learn. Mem.* 69(2): 106-125.
- Brody H.** (1955). Organization of the cerebral cortex. III. A study of aging in the human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 102(2): 511-6.
- Bryant P.A., Boakes R.A. et McGregor I.S.** (1993) Taste-potentiated odor aversion learning based on amphetamine. *Australian J. of Psychol.* 45(2): 110-110.
- Buck, L. et Axel, R.** (1991) A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors: A Molecular Basis for Odor Recognition. *Cell* (65): 175-187.
- Bunsey M. et Eichenbaum H.** (1996). Conservation of hippocampal memory function in rats and humans. *Nature* 379(6562): 255-257.
- Burk J.A., Herzog C.D., Porter M.C. et Sarter M.** (2002). Interactions between aging and cortical cholinergic deafferentation on attention. *Neurobiol. Aging* 23(3): 467-477.
- Burke S.N. et Barnes C.A.** (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 7(1): 30-40.
- Bussy P.C. et Klüver H.** (1955). An anatomical investigation of the temporal lobe in the monkey (*Macaca mulatta*). *J. Comp. Neurol.* 103(2): 151-251.

Calu D.J., Roesch M.R., Stalnaker T.A. et Schoenbaum G. (2006). Associative Encoding in Posterior Piriform Cortex during Odor Discrimination and Reversal Learning. *Cereb. Cortex* In Press

Cardinal R.N., Parkinson J.A., Hall J. et Everitt B.J. (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 26(3): 321-352.

Cardinal R.N., Parkinson J.A., Hall J. et Everitt B.J. (2003). The contribution of the amygdala, nucleus accumbens, and prefrontal cortex to emotion and motivated behaviour. *International Congress Series* 1250 : 347-370.

Chaillan F.A., Roman F.S. et Soumireu-Mourat B. (1996). Modulation of synaptic plasticity in the hippocampus and piriform cortex by physiologically meaningful olfactory cues in olfactory association task. *J. Physiol. Paris* 90: 343-347.

Chaillan F.A., Truchet B., Roman F.S. et Soumireu-Mourat B. (1999). Early polysynaptic potentiation recorded in the dentate gyrus during an associative learning task. *Neurosci.* 94: 443-451.

Chambers K.C. et Bernstein I.L. (2003). Conditioned taste aversion. In: *Handbook of olfaction and gustation. Second Edition revised and expanded.* Ed.: R.L. Doty. Marcel Decker, Inc., N.Y.

Chaudhuri A., Zangenehpour S., Rahbar-Dehgan F. et Ye F. (2000). Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiol. Exp.* 60 : 403-410.

Churchill J.D., Stanis J.J., Press C., Kushelev M. et Greenough W.T. (2003). Is procedural memory relatively spared from age effects? *Neurobiol. of Aging* 24(6): 883-892.

Clark R.E. et Squire L.R. (1998). Classical conditioning and brain systems: the role of awareness. *Science* 280(5360): 77-81.

Clarke J.C., Westbrook R.F. et Irwin J. (1979) Potentiation instead of overshadowing in the pigeon. *Behav. Neural Biol.* 25(1):18-29.

Clements K.M., Saunders A.J., Robertson B.A. et Wainwright P.E. (2007). Spontaneously hypertensive, Wistar Kyoto and Sprague-Dawley rats differ in their use of place and response strategies in the water radial arm maze. *Neurobiol. Learn. Mem.* 87(2): 285-294.

Coburn K.L., Garcia J., Kiefer S.W. et Rusiniak K.W. (1984) Taste potentiation of poisoned odor by temporal contiguity. *Behav. Neurosci.* 98(5): 813-819.

Cole A.J., Saffen D.W., Baraban J.M. et Worley P.F. (1989). Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature* 340 (6233): 474-476.

Cousens G. et 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(5): 1092-1103.

-D-

Da Costa A.P.C., Broad K.D. et Kendrick K.M. (1997). Olfactory memory and maternal behaviour-induced changes in *c-fos* and *zif/268* mRNA expression in the sheep brain. *Mol. Brain Res.* 46(1-2) : 63-76.

Dade L.A., Zatorre R.J. et Jones-Gotman M. (2002). Olfactory learning: convergent findings from lesion and brain imaging studies in humans. *Brain* 125 : 86-101.

Dalley J.W., Cardinal R.N. et Robbins T.W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28(7): 771-784

Datiche F. et Cattarelli M. (1996). Reciprocal and Topographic Connections Between the Piriform and Prefrontal Cortices in the Rat: A Tracing Study Using the B Subunit of the Cholera Toxin. *Brain Res. Bull.* 14(6) : 391-398.

Datiche F., Roulet F. et Cattarelli M. (2001). Expression of Fos in the piriform cortex after acquisition of olfactory learning: An immunohistochemical study in the rat. *Brain Res. Bull.* 55(1) : 95-99.

Davis S, Bozon B. et Laroche S. (2003). How necessary is the activation of the immediate early gene *zif268* in synaptic plasticity and learning. *Behav. Brain Res.* 142: 17-30.

Day H.E., Masini C.V. et Campeau S. (2004). The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res.* 1025(1-2): 139-151.

Decker M.W. (1987). The effects of aging on hippocampal and cortical projections of the forebrain cholinergic system. *Brain Res.* 434(4): 423-438.

Decker M.W. et McGaugh J.L. (1991). The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. *Synapse* 7(2): 151-168.

Delatour B. et Witter M.P. (2002). Projections from the parahippocampal region to the prefrontal cortex in the rat: evidence of multiple pathways. *EJN* 15: 1400-1407.

Desjardins S., Mayo W., Vallée M., Hancock D., Le Moal M., Simon H. et Abrous D.N. (1997). Effect of aging on the basal expression of c-Fos, c-Jun and Egr-1 proteins in the hippocampus. *Neurobiol. Aging* 18(1): 37-44.

Dieguez D.Jr et Barea-Rodriguez E.J. (2004). Aging impairs the late phase of long-term potentiation at the medial perforant path-CA3 synapse in awake rats. *Synapse* 52(1): 53-61.

Domjan M. (2000). "The essential of conditioning and learning. Second Edition." Wadsworth/Thomson Learning 2000, Ed. M. Domjan. Londre.

Douglas R.M., Dragunow M., et Robertson H.A. (1988). High-frequency discharge of dentate granule cells, but not long-term potentiation, induces c-fos protein. *Brain Res.* 464(3): 259-262.

Dudaï Y. (2002). Memory from A to Z – Keywords, concepts and beyond. Edition Oxford.

Dunnet S.B., Eveden J.L. et Iversen S.D. (1988). Delay-dependent short-term memory deficits in aged rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 96: 174-180.

Durlach P.J. et Rescorla R.A. (1980). Potentiation rather than overshadowing in flavor-aversion learning: an analysis in term of within compound association. *J. Exp. Psychol.: Animal Behav. Process.* 6: 175-187.

-E-

Egorov A.V., Hamam B.N., Fransen E., Hasselmo M.E. et Alonso A.A. (2002). Graded persistent activity in entorhinal cortex neurons. *Nature* 420(6912): 173-178.

Eichenbaum H. (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1(1): 41-50.

Ennaceur A. et Delacour J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* 31(1): 47-59.

Escobar M.L. et Bermúdez-Rattoni F. (2000) Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* 852: 208-212.

-F-

Farivar R., Zanenehpour S. et Chaudhuri A. (2004) Cellular-resolution activity mapping of the brain using immediate-early gene expression. *Front. In Biosciences* 9: 104-109.

Ferreira G., Ferry B., Meurisse M. et Levy F. (2006). Forebrain structures specifically activated by conditioned taste aversion. *Behav. Neurosci.* 120(4): 952-962.

Ferry B., Oberling P., Jarrad L. E. et Di Scala G. (1996). Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesion in the Rat. *Behav. Neurosci.* 110(3): 443-450.

Ferry B., Sandner G. et Di Scala G. (1997). Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste-potentiated odor aversion. *Neurobiol. Learn. and Mem.* 64: 169-180.

Ferry B., Wirth S. et Di Scala G. (1999). Functional interaction between entorhinal cortex and basolateral amygdala during trace conditioning of odor aversion in the Rat. *Behav. Neurosci.* 113(1): 118-125.

Ferry B., Ferreira G., Traissard N. et Majchrzak M. (2006). Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat. *Behav. Neurosci.* 120(5):1180-1186.

Filipowski R.K., Rydz M. et Kaczmarek L. (2001). Expression of c-Fos, Fos B, Jun B, and Zif268 transcription factor protein in rats barrel cortex following apomorphine-evoked whisking behaviour. *Neurosci.* 106(4): 679-688.

Flood D.G. (1993). Critical issues in the analysis of dendritic extent in aging humans, primates and rodents. *Neurobiol. Aging* 14: 649-654.

Foster T.C. et Norris C.M. (1997). Age-associated changes in Ca²⁺ dependent processes: relation to hippocampal synaptic plasticity. *Hippocampus* 7: 602-612.

Foster, T. C. (1999). Involvement of hippocampal synaptic plasticity in age-related memory decline. *Brain Res. Rev.* 30(3) : 236-249.

Foster, T. C. (2002). Regulation of synaptic plasticity in memory and memory decline with aging. pp:283-303. In *Plasticity in the Adult Brain: From Genes to Neurotherapy*. Ed. M.A. Hofman, G.J. Boer, A.J.G.D. Holtmaat, E.J.W. Van Someren, J. Verhaagen and D.F. Swaab. Elsevier Publication.

Freeman F.M. et Rose S.P. (1995). MK-801 blockade of Fos and Jun expression following passive avoidance training in the chick. *Eur. J. Neurosci.* 7: 563-569.

French P.J., O'Connor V., Jones M.W., Davis S., Errington M.L., Voss K., Truchet B., Wotjak C., Stean T., Doyere V., Maroun M., Laroche S. et Bliss T.V. (2001). Subfield-specific immediate early gene expression associated with hippocampal long-term potentiation in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 3(5): 968-976.

Frick K.M., Baxter M.G., Markowska A.L., Olton D.S. et Price D.L. (1995) Age-related spatial reference and working memory deficits assessed in water maze. *Neurobiol. Aging* 16: 149-160.

Fujisaki M., Hashimoto K., Iyo, M. et Chiba, T. (2004). Role of the amygdalo-hippocampal transition area in the fear expression: evaluation by behavior and immediate early gene expression. *Neurosci.* 124(1): 247-260.

Fyhn M, Molden S, Witter MP Moser E et Moser MB (2004) Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305: 1258-1264.

- Gale G. D., Anagnostaras S. G., Godsil B. P., Mitchell S., Nozawa T., Sage J. R., Wiltgen B. et Fanselow M. S.** (2004). Role of the Basolateral Amygdala in the Storage of Fear Memories across the Adult Lifetime of Rats. *J. Neurosci.* 124(15): 3810-3815.
- Gall C. M., Hess U.S. et Lynch G.** (1998). Mapping Brain Networks Engaged by, and Changed by, Learning. *Neurobiol. Learn. and Mem.* 70(1-2): 14-36.
- Gallagher M., Bostock E., et King R.** (1985). Effects of opiate antagonists on spatial memory in young and aged rats. *Behav. Neural. Biol.* 44(3): 374-385.
- Gallagher M. et Colombo P.J.** (1995). Ageing: the cholinergic hypothesis of cognitive decline. *Cur. Op. Neurobi.* 5(2) : 161-168.
- Gallagher M. et Chiba A.A.** (1996). The amygdala and emotion. *Curr. Op. Neurobi.* 6(2) : 221-227.
- Gagliese L. et Melzack R.** (2000). Age differences in nociception and pain behaviours in the rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24(8): 843-854.
- Garcia J., Kimeldorf D.J. et Koelling R.A.** (1955) Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science* 122(3160): 157-158.
- Garcia J., Kimeldorf D.J., Hunt E.J. and Davies B.P.** (1956) Food and water consumption of rats during exposure to γ -radiation. *Radiation Res.* 4: 33-41.
- Garcia J. et Kimeldorf D.J.** (1957) Temporal relation within the conditioning of a saccharin aversion through radiation exposure. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 50(2): 180-183.
- Garcia J. et Koelling R.A.** (1966) Relation of cue to consequence in avoidance learning. *Psychonomic Science* 22: 123-124.
- Garcia J. et Ervin F.R.** (1968) Appetites, aversions, and addictions: a model for visceral memory. *Recent Adv. Biol. Psychiatry* 10:284-293.
- Garcia J., McGowan B.K., Ervin F.R. et Koelling R.A.** (1968) Cues: their relative effectiveness as a function of the reinforcer. *Science* 160(829):794-795.
- Garcia J., Lasiter P.S., Bermúdez-Rattoni F. et Deems D.A.** (1989). A general theory of aversions learning. In "Experimental assessments and clinical applications of conditioned food aversions" Ed: M.S. Braveman et P. Bronstein. Annals of the New York Academy of Sciences 443: 8-21.
- Garcia J.** (1992) "Taste aversion and preference learning in animals" in "Encyclopedia of learning and memory." Mac Millan References 1992, Ed. L. Squire. NY.
- Gashler A. et Sukhatme V.P.** (1995). Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 50:191-224.
- Geinisman Y., Ganeshina O., Yoshida R., Berry R. W., Disterhoft J. F. et Gallagher M.** (2004). Aging, spatial learning, and total synapse number in the rat CA1 stratum radiatum. *Neurobiol. of Aging* 25(3) : 407-416.
- Gilbert P.E., Campbell A. et Kesner R.P.** (2003). The role of the amygdala in conditioned flavor preference. *Neurobiol. Learn. and Mem.* 79(1) : 118-121.
- Grandchamp N. et Schenk F.** (2006). Adaptive changes in a radial maze task: Efficient selection of baited arms with reduced foraging in senescent hooded rats. *Behav. Brain Res.* 168(1): 161-166.

Grigson P.S., Shimura T. et Norgren R. (1997a). Brainstem lesions and gustatory function: II. The role of the nucleus of the solitary tract in Na⁺ appetite, conditioned taste aversion, and condition odor aversion in Rats. *Behav. Neurosci.* 111(1): 169-179.

Grigson P.S., Shimura T. et Norgren R. (1997b). Brainstem lesions and gustatory function: III. The role of the nucleus of the solitary tract and the parabrachial nucleus in retention of a conditioned taste aversion in rats. *Behav. Neurosci.* 111(1): 180-187.

Grimm R., Schicknik H., Riede I., Gundelfinger E.D., Herdegen T., Zschatter W. et Tischmeyer W. (1997). Suppression of c-fos induction in rat brain impairs retention of a brightness discrimination reaction. *Learn. Mem.* 3: 402-413.

Guzowski J.F., Setlow B., Wagner E.K. et McGaugh J.L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes *Arc*, *c-fos* and *zif268*. *J. of Neurosci.* 21(14): 5089-5098.

Guzowski J.F., Setlow B., Wagner E.K. et McGaugh J.L. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* 12: 86-104.

-H-

Haberly L.B. et Price J.L. (1978) Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 178(4): 711-40.

Haberly L.B. (1985). Neuronal circuitry in olfactory cortex: anatomy and functional implications. *Chem. Senses* 10: 219-238.

Haberly L.B. et Bower J.M. (1989). Olfactory cortex: model circuit for study of associative memory? *TINS* 12(7): 258-264.

Haberly L.B. (2001). Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. *Chem. Senses* 26: 551-576.

Hall J., Thomas K.L., et Everitt B.J. (2000). Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning. *Nat. Neurosci.* 3(6): 533-535.

Hall J., Thomas K.L. et Everitt B.J. (2001). Cellular Imaging of *zif268* Expression in the Hippocampus and Amygdala during Contextual and Cued Fear Memory Retrieval: Selective Activation of Hippocampal CA1 Neurons during the Recall of Contextual Memories. *J. Neurosci.* 21(6): 2186-2193.

Hankins W.G., Garcia J. et Rusiniak K.W. (1973) Dissociation of odor and taste in baitshyness. *Behav. Biol.* 8(3): 407-419.

Hasselmo M.E. (1995). Neuromodulation and cortical function: modeling the physiological basis of behavior. *Behav. Brain Res.* 67(1): 1-27.

Hasselmo M.E., Schnell E. et Barkai E. (1995). Dynamics of learning and recall at excitatory recurrent synapses and cholinergic modulation in rat hippocampal region CA3. *J. Neurosci.* 15(7): 5249-5262.

Hasselmo M.E. (1999). Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *TINS* 3(9): 351-359.

Hatfield T., Graham P.W. and Gallagher M. (1992). Taste-potentiated odor aversion learning: role of the amygdaloid basolateral complex and central nucleus. *Behav. Neurosci.* 106(2): 286-293.

Hatfield T., Han J.-S., Conley M., Gallagher M. et Holland P. (1996). Neurotoxic lesions of basolateral, but not central amygdala interfere with pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. *J. Neurosci.* 16(16): 5256-65.

Hayama T. et Ogawa H. (2001). Two loci of the insular cortex project to the taste zone of the nucleus of solitary tract in rats. *Neurosci. Letter* 303: 49-52.

Hendergen T. et Leah J.D. (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox and CREB/ATF proteins. *Brain Res. Rev.* 28: 370-490.

Hernádi I., Karádi Z., Víg J., Petyko Z., R. Egyed, Berta B. et Lénárd L. (2000). Alterations of conditioned taste aversion after microiontophoretically applied neurotoxins in the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res. Bull.* 53(6): 751-758.

Herrera D.G. et Robertson H.A. (1996). Activation of *c-fos* in the brain. *Prog. Neurobiol.* 50: 83-107.

Hess U.S., Lynch G. et Gall C.M. (1995a). Changes in *c-fos* mRNA expression in rat brain during odor discrimination learning: differential involvement of hippocampal subfields CA1 and CA3. *J. Neurosci.* 15: 4786-4795.

Hess U.S., Lynch G. et Gall C.M. (1995b). Regional patterns of *c-fos* mRNA expression in rat hippocampus following exploration of a novel environment versus performance of a well-learned discrimination. *J. Neurosci.* 15: 7796-7809.

Hess U.S., Gall C.M., Granger R. et Lynch G. (1997). Differential patterns of *c-fos* mRNA expression in amygdala during successive stages of odor discrimination learning. *Learn. Mem.* 4: 262-283.

Hinderliter C.F. et Misanin J.R. (1993). Context familiarity and delayed conditioned taste aversion in young-adult and old-age rats. *Percept. Mot. Skills* 77: 1403-1406.

Hinderliter C.F. et Misanin J.R. (1995). Age differences and the interstimulus interval context in long-delay taste-aversion conditioning of rats. *Psychol. Rep.* 76(2): 636-638.

Holahan M.R. et White M.N. (2004). Amygdala *c-Fos* induction corresponds to unconditioned and conditioned aversive stimuli but not to freezing. *Behav. Brain Res.* 152(1): 109-120.

Holder M.D. et Garcia J. (1987). Role of temporal order and odor intensity in taste-potentiated odor aversions. *Behav. Neurosci.* 101(2): 158-163.

Holland P.C. (2006). Limitations on representation-mediated potentiation of flavour or odor aversions. *Q. J. Exp. Psychol.* 59(2): 233-250.

Houpt T.A. (1995). Molecular approaches to conditioned taste aversion. *Appetite* 24(3): 259.

Huang T., Yan J. et Kang Y. (2003). Role of the central amygdaloid nucleus in shaping the discharge of gustatory neurons in the rat parabrachial nucleus. *Brain Res. Bull.* 61: 443-452.

-I-

Ingram D.K. et Peacock L.J. (1980). Conditioned taste aversion as a function of age in mature male rats. *Exp. Aging Res.* 6: 113-123.

Inui T., Shimura T. et Yamamoto T. (2006). Effects of brain lesions on taste-potentiated odor aversion in rats. *Behav. Neurosci.* 120(3): 590-599.

-J-

Johnson D.M., Illig K.R., Behan M. et Haberly L.B. (2000) New features of connectivity in piriform cortex visualized by intracellular injection of pyramidal cells suggest that "primary" olfactory cortex functions like "association" cortex in other sensory systems. *J. Neurosci.* 20(18):6974-82.

Jones M.W., French P.J., Bliss T.V. et Rosenblum K. (1999). Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J. Neurosci.* 19(21): RC36.

Jones M.W., Errington M.L., French P.J., Fine A., Bliss T.V., Garel S., Charnay P., Bozon B., Laroche S. et Davis S. (2001). A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nat. Neurosci.* 4(3):289-296.

Jung M. W. et Larson J. (1994). Further characteristics of long-term potentialisation in piriform cortex. *Synapse* 18: 298-306.

-K-

Kaczmarek L., Siedlecki J.A. et Danysz W. (1988). Prot-oncogene c-fos induction in rat hippocampus. *Brain Res.* 427(2): 183-186.

Kaczmarek L. (2000). Gene expression in learning process. *Acta Neurobiologicae Experimentalis* 60: 419-424.

Kaczmarek L. (2002). c-Fos in learning: beyond the mapping of neuronal activity. In *Handbook of chemical neuroanatomy vol 19: IEG and inducible transcription factors of the central nervous system function and dysfunction*. pp: 189-215. Ed: Kaczmarek L. and Herrera H. J. Elsevier science.

Kadohisa M. et Wilson D.A. (2006). Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. *PNAS* 103(41): 15206-15211.

Kajiwarra R., Takashima I., Mimura Y., Witter M.P. et Iijima T. (2002). Amygdala Input Promotes Spread of Excitatory Neural Activity From Perirhinal Cortex to the Entorhinal-Hippocampal Circuit. *J. Neurophysiol.* 89(4): 2176-2184.

Kalin N.H., Shelton S.E., Davidson R.J. et Kelley A.E. (2001). The primate amygdala mediates acute fear but not the behavioral and physiological components of anxious temperament. *J. Neurosci.* 21: 2067-2074.
Kaminska et al. 2002

Kelly K.M., Nadon N.L., Morrison J.H., Thibault O., Barnes C.A. et Blalock E.M. (2006). The neurobiology of aging. *Epilepsy Res.* 68S: S5-S20.

Kiefer S.W., Rusiniak K.W. et Garcia J. (1982). Flavor illness aversions: gustatory neocortex ablations disrupt taste but not taste potentiated odor aversion cues. *J. Comp. Psychol.* 4: 540-548.

Kilpatrick L. et Cahill L. (2003) Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. *Behav. Neurosci.* 117(1): 184-188.

Knafo S., Grossman Y., Barkai E. et Benschalom G. (2001) Olfactory learning is associated with increased spine density along apical dendrites of pyramidal neurons in the rat piriform cortex. *EJN* 13(3):633-668.

Knafo S., Libersat F. et Barkai E. (2005) Olfactory learning-induced morphological modifications in single dendritic spines of young rats. *EJN* 21(8):2217-26.

Knapska E. et Kaczmarek L. (2004) A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox24/Tis8/ZENK? *Prog. Neurobiol.* 74: 183-211.

Koh M.T., Wilkins E.E. et Bernstein I.L. (2003) Novel taste elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: implication for taste aversion learning. *Behav. Neurosci.* 117(6): 1416-1422.

Koh M.T. et Bernstein I.L. (2005) Mapping conditioned taste aversion associations using c-Fos reveals a dynamic role for insular cortex. *Behav. Neurosci.* 119(2): 388-398.

Kosar E., Grill H.J. et Norgren R. (1984). Gustatory cortex in the Rat. I. Physiology properties and cytoarchitecture. *Brain Res.* 379: 329-341.

Kosar E., Grill H.J. et Norgren R. (1986). Gustatory cortex in the Rat. I. Physiology properties and cytoarchitecture. *Brain Res.* 379: 329-341.

Kosiorek P., Hryniewicz A., Bialuk I., Zawadzka A. et Winnicka M.M. (2003) Cannabinoids alter recognition memory in rats. *Pol. J. Pharmacol.* 55: 903-910.

Kraemer S. et Apfelbach R. (2004) Olfactory sensitivity, learning and cognition in young and age male wistar rats. *Physiol. & Behav.* 81: 435-442.

Krettek J.E. et Price J.L. (1977) The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat. *J. Comp. Neurol.* 171(2): 157-91.

Kudo K., Wati H., Qiao C., Arita J. et Kanba S. (1999). Age-related disturbance of memory and CREB phosphorylation in CA1 area of hippocampus of rats. *Brain Res.* 1054(1): 30-37.

Kucharski D. et Spear N.E. (1985) Potentiation and overshadowing in preweanling and adult rats. *J Exp Psychol Anim Behav Process.* 11(1):15-34.

-L-

Lamprecht R. et Dudai Y. (1996). Transient Expression of c-Fos in Rat Amygdala During Training Is Required for Encoding Conditioned Taste Aversion Memory. *Learn. Mem.* 3: 31-41.

Lamprecht R., Hazvi S. et Dudai Y. (1997). cAMP response element -binding protein in the amygdala is required for long- but not short- term conditioned taste aversion memory. *J. Neurosci.* 17(21): 8443-8450.

Lamprecht R. et Dudai Y. (2000). The amygdala in conditioned taste aversion: it's there, but where. In: *The Amygdala: a functional analysis.* Ed.: J. Aggleton. Oxford University Press, N.Y

Lanahan A., Lyford G., Stevenson G.S., Worley P.F. et Barnes C.A. (1997). Selective alteration of long-term potentiation-induced transcriptional response in hippocampus of aged, memory-impaired rats. *J. Neurosci.* 17(8): 2876-2885.

Lasiter P.S. et Glanzman D.L. (1982). Cortical substrates of taste aversion learning: dorsal prepiriform (insular) lesions disrupt taste aversion learning. *J Comp Physiol Psychol* 96(3): 376-92.

Lasiter P.S., Deems D.A., Oetting R.L. et Garcia J. (1985a). Taste discriminations in rats lacking anterior insular gustatory neocortex. *Physiol Behav* 35(2): 277-85.

Lasiter P.S., Deems D.A. et Garcia J. (1985b). Involvement of the anterior insular gustatory neocortex in taste-potentiated odor aversion learning. *Physiol Behav* 34: 71-77.

Leblanc P. et Soffie M. (1999). Effects of age on short-term memory for time in rats. *Exp. Aging Res.* 25(3): 267-284.

LeDoux J.E. (2000). Emotion Circuits in the Brain. *Ann Rev Neurosci.* 23: 155-184.

Lee Y.I., Park K.H., Baik S.H. et Cha C.I. (1998). Attenuation of c-Fos basal expression in the cerebral cortex of aged rat. *NeuroReport* 9: 2733-2736.

Lemaire P., Vesque C., Schmitt J., Stunnenberg H., Frank R. et Charnay P. (1990). The serum-inducible mouse gene Krox-24 encodes a sequence-specific transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* 10(7): 3456-3467.

LeMagnen J. (1959). The role of olfacto-gustatory stimuli in the regulation of the alimentary behavior of the mammal. *J. Psychol. Norm. Pathol. (Paris)* 56:137-160.

Levy W.B. et Steward O. (1979). Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation. *Brain Res.* 175(2): 233-245.

Li H., Matsumoto K. et Watanabe H. (1999). Different effects of unilateral and bilateral hippocampal lesions in rats on the performance of radial maze and odor-paired associate tasks. *Brain Res Bull* 48(1): 113-119.

Li L., Carter J., Gao X., Whitehead J. et Tourtellotte W.G. (2005). The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 25(23):10286-10300.

Lichenstein G. et Cassini M.H. (2001). Behavioral mechanisms underlying food aversion in guinea pig. *Etologia* 9: 29-34.

Litaudon P., Mouly G., Sullivan R., Gervais R. et Cattarelli M. (1997). Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye. *EJN* 9: 1593-1602.

Lonze B.E. et Ginty D.D. (2002). Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35: 605-623.

Luskin M.B. et 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.

Lynch G., Gall C. et Cotman C. (1977). Temporal parameters of axon "sprouting" in the brain of the adult rat. *Exp. Neurol.* 54(1): 179-183.

-M-

Malkani S. et Rosen J.B. (2000). Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neurosci.* 97(4): 693-702.

Malkani S., Wallace K.J., Donley M.P. et Rosen J.B. (2004). An egr-1 (zif268) Antisense Oligodeoxynucleotide Infused Into the Amygdala Disrupts Fear Conditioning. *Learn. Mem.* 11(5): 617-624.

Mc Donald A.J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog. Neurobiol.* 55: 257-332.

Mc Gaugh J.L., Ferry B., Vardarjanova A. et Roozndal B. (2000). Amygdala: role in modulation of memory storage. In: *The Amygdala: a functional analysis*. Ed.: J. Aggleton. Oxford University Press, N.Y.

Mc Gaugh J.L. (2002). Memory consolidation and the amygdala: a systems perspective. *TINS* 25(9): 456-461.

McGaugh J.L. (2004). The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:1-28.

McEchron M.D., Cheng A.Y. et Gilmarin M.R. (2004) Trace fear conditioning is reduced in the aging rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82: 71-76.

Merrill D.A., Chiba A.A. et Tuszynski M.H. (2001). Conservation of neuronal number and size in the entorhinal cortex of behaviorally characterized aged rats. *J. Comp. Neurol.* 438(4):445-456.

Mickley G.A., Kenmuir C.L., McMullen C.A., Yocom A.M., Valentine E.L., Dengler-Criss C.M., Weber B., Wellman J.A. et Remmers-Roeber D.R. (2004). Dynamic processing of taste aversion extinction in the brain. *Brain Res.* 1016(1): 79-89.

Mickley G.A., Kenmuir C.L., Yocom A.M., Wellman J.A. et Biada J.M. (2005). A role for prefrontal cortex in the extinction of a conditioned taste aversion. *Brain Res.* 1051(1-2): 176-182.

Miller J. S., Nonneman A. J., Kelly K. S., Neisewander J.L. et Isaac W. L. (1986). Disruption of neophobia, conditioned odor aversion in rats with hippocampal lesions. *Behav. Neural. Biol.* 45: 240-253.

Miranda M.I., Ferreira G., Ramirez-Lugo L. et Bermudez-Rattoni F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *PNAS* 99(17): 11417-11422.

- Miranda M.I., Ferreira G., Ramirez-Lugo L. et Bermudez-Rattoni F.** (2003a). Role of cholinergic system on the construction of memories: Taste memory encoding. *Neurobiol. Learn. Mem.* 80(3): 211-222.
- Miranda M.I., LaLumiere R.T., Buen T.V., Bermudez-Rattoni F. et McGaugh J.L.** (2003b). Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *Eur. J. Neurosci.* 18(9): 2605-2610.
- Misanin J.R., Hoefel T.D., Riedy C.A. et Hinderliter C.F.** (1997). Remote and proximal US preexposure and aging effects in taste aversion learning in rats. *Physiol. Behav.* 61(2): 221-224.
- Misanin J.R., Collins M., Rushanan S., Anderson M.J., Goodhart M. et Hinderliter C.F.** (2002a). Aging facilitates long-trace taste-aversion conditioning in rats. *Physiol. And Behav.* 75: 759-764.
- Misanin J.R., Goodhart M.G., Anderson M.J. et Hinderliter C.F.** (2002b). The interaction of age and unconditioned stimulus intensity on long-trace conditioned flavor aversion in rats. *Dev. Psychobiol.* 40(2): 131-137.
- Miyagawa H., Hasegawa M., Fukuta T., Amano M., Yamada K. et Nabeshima T.** (1998). Dissociation of impairment between spatial memory, and motor function and emotional behavior in aged rats. *Behav. Brain Res.* 91(1-2): 73-81.
- Mizumori S.J., Lavoie A.M. et Kalyani A.** (1996). Redistribution of spatial representation in the hippocampus of aged rats performing a spatial memory task. *Behav. Neurosci.* 110(5): 1006-1016.
- Moffat S.D., Zonderman A.B. et Resnick S.M.** (2001). Age differences in spatial memory in a virtual environment navigation task. *Neurobiol Aging.* 22(5): 787-796.
- Montag-Sallaz M., Welzl H., Kuhl D., Montag D. et Schachner M.** (1999). Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain. *J. Neurobiol.* 38(2): 234-246.
- Morgan M.A. et LeDoux J.E** (1999). Contribution of Ventrolateral Prefrontal Cortex to the Acquisition and Extinction of Conditioned Fear in Rats. *Neurobiol. Learn. Mem.* 72(3): 244-251.
- Morgane P.J. et Molker D.J.** (2006). The limbic brain: Continuing resolution. *Neurosci. & Behav. Rev.* 30(2): 119-125.
- Morris R., Frey S., Kasambira T. et Petrides M.** (1999). Ibotenic acid lesions of the basolateral, but not the central, amygdala interfere with conditioned taste aversion: evidence from a combined behavioral and anatomical tract-tracing investigation. *Behav. Neurosci.* 113(2):291-302.
- Morris R.G.M.** (1981) Spatial localisation does not require the presence of local cues. *Learn. and Motivation* 12: 239-260.
- Morrow B.A., Elsworth J.D., Inglis F.M. et Roth R.H.** (1999). An antisense oligonucleotide reverses the footshock-induced expression of fos in the rat medial prefrontal cortex and the subsequent expression of conditioned fear-induced immobility. *J. Neurosci.* 19(13): 5666-5673.
- Mouly A.M., Fort A., Ben-Boutayab N. et Gervais R.** (2001). Olfactory learning induces differential long-lasting changes in rat central olfactory pathways. *Neurosci.* 102(1): 11-21.
- Mouly A.M. et Gervais R.** (2002). Polysynaptic potentiation at different levels of rat olfactory pathways following learning. *Learn. Mem.* 9: 66-75.
- Mouly A.M. et DiScala G.** (2006). Entorhinal cortex stimulation modulates amygdala and piriform cortex responses to olfactory bulb inputs in the rat. *Neurosci.* 137(4): 1131-1141.
- Mumby D.G.** (2004). Object recognition. In: *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Ed.: I.Q. Whishaw and B. Kolb. Oxford University Press, N.Y.
- Müller R., Bravo R., Burckhardt J. et Curran T.** (1984). Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 312(5996): 716-720.

Müller M. et Fendt M. (2004). Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. *Behav. Brain Res.* 167(1): 57-62.

-N-

Nader K., Schafe G.E. et Le Doux J.E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406: 722-726.

Nader K. (2003). Memory traces unbound. *T.I.N.S.* 26: 65-72.

Nakashima M., Uemura M., Yasui K., Ozaki H. S., Tabata S. et Taen A. (2000). An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. *Neurosci. Res.* 36 : 267-309.

Nakazawa K., Sun L.D., Quirk M. C., Rondi-Reig L., Wilson M.A. et Tonagawa S. (2003). Hippocampal CA3 NMDA receptors are crucial for memory acquisition of one-time experience. *Neuron* 38: 305-315.

Navarro M., Spray K.J., Cubero I., Thiele T.E. et Bernstein I.L. (2000). cFos induction during conditioned taste aversion expression varies with the aversion strength. *Brain Res.* 887: 450-453.

Nerad L., Ramirez-Amaya V., Ormsby C.E. et Bermudez-Rattoni F. (1996). Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 66(1): 44-50.

Nicholson D.A., Yoshida R., Berry R.W., Gallagher M. et Geinisman Y. (2004). Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. *J. Neurosci.* 24(35): 7648-7653.

Nicolle M.M., Gallagher M. et McKinney M. (1999). No loss of synaptic proteins in the hippocampus of aged, behaviorally impaired rats. *Neurobiol. Aging* 20: 343-348.

Nikolaev E., Werka T. et Kaczmarek L. (1992). C-fos protooncogene expression in rat brain after long-term training of toxo-xay active avoidance reaction. *Behav. Brain Res.* 48: 91-94.

Nitschke J.B., Dixon G.E., Sarinopoulos I., Short S.J., Cohen J.D., Smith E.E., Kosslyn S.M., Rose R.M. et Davidson R.J. (2006). Altering expectancy dampens neural response to aversive taste in primary taste cortex. *Nat. Neurosci.* 9(3): 435-442.

Norgren R. (1995). Gustatory system. In "The Rat nervous system". Ed: G. Paxinos, Academic press, London. Nowlis et al. 1980

Nowlis G.H., Frank M.E. et Pfaffmann C. (1980). Specificity of acquired aversions to taste qualities in hamsters and rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 94(5): 932-942.

-O-

O'Shea M., McGregor I.S. et Mallet P.E. (2006) Repeated cannabinoid exposure during perinatal, adolescent or early adult ages produces similar longlasting deficits in object recognition and reduced social interaction in rats. *J. Psychopharmacol.* 20(5): 611-621.

Ogawa H., Ito S., Murayama N. et Hasegawa K. (1990). Taste area in granular and dysgranular insular cortices in the rat identified by stimulation of the entire oral cavity. *Neurosci. Res.* 9(3): 196-201.

Ogawa H. et Wang X.D. (2002). Neurons in the cortical taste area receive nociceptive inputs from the whole body as well as the oral cavity in the rat. *Neurosci. Letter* 322(2): 87-90.

Ongür D. et Price J.L. (2000). The Organization of Networks within the Orbital and Medial Prefrontal Cortex of Rats, Monkeys and Humans. *Cereb. Cortex* 10(3): 206-219.
Otmalkhova et Lisman 1999

Otmakhova N.A. et Lisman J.E. (1999). Dopamine selectively inhibits the direct cortical pathway to the CA1 hippocampal region. *J. Neurosci.* 19(4): 1437-1445.

Otto T., Eichenbaum H., Lynch F., Schottler F. et Staubli U. (1991) Hippocampus and olfactory discrimination learning: effects of entorhinal cortex lesions on olfactory learning and memory in a successive-cue, go-no-go task. *Behav. Neurosci.* 105: 111-119.

Otto T. et Eichenbaum H. (1992). Complementary roles of the orbital prefrontal cortex and the perirhinal-entorhinal cortices in an odor-guided delayed-nonmatching-to-sample task. *Behav. Neurosci.* 106(5): 762-775.

-P-

Packard M.G. et Wingard J.C. (2004). Amygdala and "emotional" modulation of the relative use of multiple memory systems. *Neurobiol. Learn. Mem.* 82(3): 243-252.

Palmerino C.C., Rusiniak K.W. et Garcia J. (1980). Flavor-illness aversions: the peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science* 208: 753-755.

Paradis S. et Cabanac M. (2004). Flavor aversion learning induced by lithium chloride in reptiles but not in amphibians. *Behav. Process.* 67(3): 11-18.

Paré D. (2003). Role of the basolateral amygdala in memory consolidation. *Prog. Neurobiol.* 70(5): 409-420.

Pavlov I.P. (1927). Conditioned reflexes. Oxford university press, Oxford, UK.

Paxinos G. et Watson C. (1986). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, Sidney.

Paz R., Pelletier J.G., Bauer E.P. et Pare D. (2006). Emotional enhancement of memory via amygdala-driven facilitation of rhinal interactions. *Nat. Neurosci.* 9(10): 1321-1329.

Peper M., Herpers M., Spreer J., Hennig J. et Zentner J. (2006). Functional neuroimaging of emotional learning and autonomic reactions. *J. Physiol. Paris* 99(4-6): 342-354.

Phillips R.G. et LeDoux J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* 106(2): 274-285.

Pitkänen A., Savander V. et LeDoux J.E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *TINS* 20(11): 517-523.

Pitkänen A. (2000). Connectivity of the amygdaloid complex. . In: *The Amygdala: a functional analysis*. Ed.: J. Aggleton. Oxford University Press, N.Y.

Plätenick J., Kuramoto N. et Yoneda Y. (2000). Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of NMDA signals. *Life Sci.* 67: 335-364.

Power A.E., McIntyre C.K., Litmanovich A. et McGaugh J.L. (2003). Cholinergic modulation of memory in the basolateral amygdala involves activation of both m1 and m2 receptors. *Behav. Pharmacol.* 14(3): 207-213.

Price J.L. (1973). An autoradiographic study of complementary laminar patterns of termination of afferent fibers to the olfactory cortex. *J. Comp. Neurol.* 150: 87-108.

Price J.L. (1985). Beyond the primary olfactory cortex: olfactory-related areas in the neocortex, thalamus and hypothalamus. *Chem. Senses* 10: 239-258.

Pyapali G.K. et Turner D.A. (1996). Increased dendritic extent in hippocampal CA1 neurons from aged F344 rats. *Neurobiol. Aging* 17(4): 601-611.

-R-

Ralph M.H. et Cheney C.D. (1993). Influence of cattle age, lithium chloride dose level, and food type in the retention of food aversions. *J. Anim. Sci.* 71(2): 373-379.

Rapp P.R. et Gallagher M. (1996). Preserved neuron number in the hippocampus of aged rats with spatial learning deficits. *PNAS* 93(18): 9926-9930.

Rapp P.R., Kansky M.T. et Roberts J.A. (1997). Impaired spatial information processing in aged monkeys with preserved recognition memory. *Neuroreport*. 27(8):1923-1928.

Rapp P.R., Morrison J.H. et Roberts J.A. (2003). Cyclic estrogen replacement improves cognitive function in aged ovariectomized rhesus monkeys. *J. Neurosci.* 23(13): 5708-5714.

Rasmussen T., Schliemann T., Sorensen J.C., Zimmer J. et West M.J. (1996). Memory impaired aged rats: No loss of principal hippocampal and subicular neurons. *Neurobiol. Aging* 17(1): 143-147.

Reilly S. (1999). The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Res. Bull.* 48(3): 239-254.

Reilly S. et Triffunovic R. (2000). Lateral parabrachial nucleus lesions in the rat: aversive and appetitive gustatory conditioning. *Brain Res. Bull.* 52(4): 269-278.

Robertson H.A. (1992). Immediate-early genes, neuronal plasticity, and memory. *Biochem. Cell. Biol.* 70: 729-737.

Roesch M.R., Stalnaker T.A. et Schoenbaum G. (2006). Associative Encoding in Anterior Piriform Cortex versus Orbitofrontal Cortex during Odor Discrimination and Reversal Learning. *Cereb. Cortex* XX: XX.

Rolls E.T., Critchley H. D., Mason R. et Wakeman E.A. (1996). Orbitofrontal cortex neurons: role in olfactory and visual association learning. *J. Neurophysiol.* 75(5): 1970-1981.

Rolls E.T. (2001) The rules of formation of the olfactory representations found in the orbitofrontal cortex olfactory areas in primates. *Chem. Senses* 26: 596-604.

Roman F., Staubli U. et Lynch G. (1987). Long-term potentiation in a cortical network during learning. *Brain Res.* 601: 265-272.

Roman F.S., Alescio-Lautier B. et Soumireu-Mourat B. (1996). Age-Related Learning and Memory Deficits in Odor-Reward Association in Rats. *Neurobiol. Aging* 17(1): 31-40.

Rose S.P. (1991). How chicks make memories: the cellular cascade from c-fos to dendritic remodelling. *TINS* 14(9): 390-397.

Rosenblum K., Schul R., Meiri N., Hadari Y.R., Zick Y. et Duai Y. (1995). Modulation of protein tyrosine phosphorylation in rat insular cortex after conditioned taste aversion training. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(4): 1157-1161.

Rosenzweig E.S., Rao G., McNaughton B.L. et Barnes C.A. (1997). Role of temporal summation in age-related long-term potentiation-induction deficits. *Hippocampus* 7(5): 549-558.

Rosenzweig E.S. et Barnes C.A. (2003). Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. *Prog. In Neurobiol.* 69(3): 143-179.

Rossier J. et Schenk F. (2003). Olfactory and/or visual cues for spatial navigation through ontogeny: olfactory cues enable the use of visual cues. *Behav. Neurosci.* 117(3):412-425.

Roulet F., Lienard F., Datiche F. et Cattarelli M. (2004). Cue valence representation studied by Fos immunocytochemistry after acquisition of a discrimination task. *Brain Res. Bull.* 64: 31-38.

Roulet F., Lienard F., Datiche F. et Cattarelli M. (2005). Fos protein expression in olfactory-related brain areas after learning and after reactivation of a slowly acquired olfactory discrimination task in the rat. *Learn. Mem.* 12(3): 307-317.

Roosendaal B., Nguyen B.T., Power A.E. et McGaugh J.L. (1999). Basolateral amygdala noradrenergic influence enables enhancement of memory consolidation induced by hippocampal glucocorticoid receptor activation. *PNAS* 96(20): 11642-11647.

Ruggiero D.A., Mraovitch S., Granata A.R., Anwar M. et Reis D.J. (1987). A role of insular cortex in cardiovascular function. *J. Comp. Neurol.* 270: 559-568.

Rusiniak K.W., Hankins W.G., Garcia J. et Brett L.P. (1979). Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste in rats. *Behav. Neural. Biol.* 25(1):1-17.

Rusiniak K.W., Palmerino C. et Garcia J. (1982a). potentiation of odor by taste in rats: test of some nonassociative factors. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96(5): 775-780.

Rusiniak K.W., Palmerino C.C., Rice A.G., Forthman D.L. et Garcia J. (1982b). Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste with toxin but not shock in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 96(4): 527-539.

-S-

Saar D., Grossman Y. et Barkai E. (1999). Reduced synaptic facilitation between pyramidal neurons in the piriform cortex after Odor Learning. *J. Neurosci.* 19(19): 8616-8622.

Saddoris M.P., Gallagher M. et Schoenbaum G. (2005). Rapid Associative Encoding in Basolateral Amygdala Depends on Connections with Orbitofrontal Cortex. *Neuron* 46(2): 321-331.

Sah P., Faber E.S L., Lopez De Aementia M. et Power J. (2003). The Amygdaloid Complex: Anatomy and Physiology. *Physiol. Rev.* 83(3): 803-834.

Sakai N. et Yamamoto T. (1998). Role of the medial and lateral parabrachial nucleus in acquisition and retention of conditioned taste aversion in rats. *Behav. Brain Res.* 93(1-2): 63-70.

Sakai N. et Yamamoto T. (2001) Effects of excitotoxic brain lesions on taste-mediated odor learning in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 75: 128-139.

Saper C.B. (1982). Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J. Comp. Neurol.* 210(2): 163-173.

Saper C.B. (2002). The central autonomic nervous system: conscious visceral perception and autonomic pattern generation. *Ann. Rev. Neurosci.* 25: 433-469.

Sara S.J., Roulet P. et Przybyslawski J. (1999) Consolidation of Memory for Odor-Reward Association: - Adrenergic Receptor Involvement in the Late Phase. *Learn. Mem.* 6(2): 88-96.

Sarter M., Hasselmo M.E., Bruno J.P. et Givens B. (2005). Unraveling the attentional functions of cortical cholinergic inputs: interactions between signal-driven and cognitive modulation of signal detection. *Brain Res. Rev.* 48(1): 98-111.

Sheng M. et Greenberg M.E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4(4): 477-485.

- Schenk F.** (1989) A homing procedure for studying spatial memory in immature and adult rodents. *J. Neurosci. Methods* 26: 249-258.
- Scheineider K. and Pinnow M.** (1994). Olfactory and gustatory stimuli in food-aversion learning of rats. *J. Gen. Psychol.* 121(2): 169-183.
- Schettino L.F. et Otto T.** (2001). Patterns of Fos expression in the amygdala and ventral perirhinal cortex induced by training in an olfactory fear conditioning paradigm. *Behav. Neurosci.* 115(6): 1257-1272.
- Schoenbaum G. et Eichenbaum H.** (1995). Information coding in the rodent prefrontal cortex. I. Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in pyriform cortex. *J. Neurophysiol.* 74(2): 733-750.
- Schoenbaum G., Chiba A.A. et Gallagher M.** (1999). Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. *J. Neurosci.* 19(5): 1876-1884.
- Schoenbaum G., Chiba A.A. et Gallagher M.** (2000). Changes in functional connectivity in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during learning and reversal training. *J. Neurosci.* 20(13): 5179-5189.
- Schoenbaum G., Nugent S., Saddoris M.P. et Gallagher M.** (2002). Teaching old rats new tricks: age-related impairments in olfactory reversal learning. *Neurobiol. Aging.* 23(4):555-564.
- Schoenbaum G., Setlow B. et Ramus S.J.** (2003). A systems approach to orbitofrontal cortex function: recordings in rat orbitofrontal cortex reveal interactions with different learning systems. *Behav. Brain Res.* 146(1-2): 19-29.
- Schoenbaum G., Setlow B., Saddoris M.P. et Gallagher M.** (2006). Encoding changes in orbitofrontal cortex in reversal-impaired aged rats. *J. Neurophysiol.* 95(3): 1509-1517.
- Sesack S.R., Deutch A.Y., Roth R.H. et Bunney BS.** (1989). Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 290(2): 213-242.
- Sevelinges Y., Gervais R., Messaoudi B., Granjon L. et Mouly A.M.** (2004). Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learn. Mem.* 11(6): 761-769.
- Sewards T.V. et Sewards M.A.** (2001). Cortical association areas in the gustatory system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25(5): 395-407.
- Shen J. et Barnes C.A.** (1996). Age-related decrease in cholinergic synaptic transmission in three hippocampal subfields. *Neurobiol. Aging.* 17(3):439-451.
- Shen J., Barnes C.A., McNaughton B.L., Skaggs W.E. et Weaver K.L.** (1997). The effect of aging on experience-dependent plasticity of hippocampal place cells. *J. Neurosci.* 17(17): 6769-6782.
- Sheng M. et Greenberg M.E.** (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 4(4): 477-485.
- Shimura T., Tokita K. et Yamamoto T.** (2002). Parabrachial unit activities after the acquisition of conditioned taste aversion to a non-preferred HCl solution in rats. *Chem. Senses* 27(2): 153-158.
- Shiple M.T. et Sanders M.S.** (1982). Special senses are really special: evidence for a reciprocal, bilateral pathway between insular cortex and nucleus parabrachialis. *Brain Res. Bull.* 8(5): 493-501.
- Smith T.D., Adams M.M., Gallagher M., Morrison J.H. et Rapp P.R.** (2000). Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J. Neurosci.* 20(17): 6587-6593.
- Smith D.V. et St John S.J.** (1999). Neural coding of gustatory information. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9(4): 427-435.

Smith J.C., Blumsack J.T., Bilek F.S., Spector A.C., Hollander G.R. et Baker D.L. (1984). Radiation-induced taste aversion as a factor in cancer therapy. *Cancer Treat.Rep.* 68: 1219-1227.

Spray K.J., Halsell C.B. et Bernstein I.L. (2000). c-Fos induction in response to saccharin after taste aversion learning depends on conditioning method. *Brain Res.* 852(1): 225-227.

Spray K.J. et Bernstein I.L. (2004). Afferent and efferent connections of the parvicellular subdivision of iNTS: defining a circuit involved in taste aversion learning. *Behav. Brain Res.* 154(1): 85-97.

Spreng M., Cotecchia S. et Schenk F. (2001) A behavioral study of alpha-1b adrenergic receptor knockout mice: increased reaction to novelty and selectively reduced learning capacities. *Neurobiol Learn Mem.* 75(2):214-229.

Staubli U., Schottler F. et Nejat-Bina D. (1987). Role of dorsomedial thalamic nucleus and piriform cortex in processing olfactory information. *Behav. Brain Res.* 25(2): 117-129.

Stone M.E., Grimes B.S. et Katz D.B. (2005). Hippocampal inactivation enhances taste learning. *Learn. Mem.* 12(6): 579-586.

Swanson L.W. et Petrovich G.D. (1998). What is the amygdala? *TINS* 21(8): 323-331.

-T-

Tanila H., Sipila P., Shapiro M. et Eichenbaum H. (1997a). Brain aging: impaired coding of novel environmental cues. *J. Neurosci.* 17(13): 5167-5174.

Tanila H., Shapiro M., Gallagher M. et Eichenbaum H. (1997b). Brain aging: changes in the nature of information coding by the hippocampus. *J. Neurosci.* 17(13): 5155-5166.

Tanila H., Shapiro M.L. et Eichenbaum H. (1997c). Discordance of spatial representation in ensembles of hippocampal place cells. *Hippocampus.* 7(6): 613-623. [Erratum in: *Hippocampus* 1998;8(1):83.]

Tanimoto S., Nakagawa T., Yamauchi Y., Minami M. et Satoh M. (2003). Differential contributions of the basolateral and central nuclei of the amygdala in the negative affective component of chemical somatic and visceral pains in rats. *EJN* 18(8): 2343-2350.

Terreberry R.R. et Neafsey E.J. (1983). Rat medial frontal cortex: a visceral motor region with a direct projection to the solitary nucleus. *Brain Res.* 278(1-2): 245-249.

Thomas K.L., Hall J. et Everitt B.J. (2002). Cellular imaging with zif268 expression in the rat nucleus accumbens and frontal cortex further dissociates the neural pathways activated following the retrieval of contextual and cued fear memory. *Eur. J. Neurosci.* 16(9): 1789-1796.

Tischmeyer W., Kaczmarek L., Strauss M., Jork R. et Matthies H. (1990). Accumulation of c-fos mRNA in rat hippocampus during acquisition of a brightness discrimination. *Behav. Neural Biol.* 54(2): 165-171.

Torras-Garcia M., Lelong J., Tronel S. et Sara S.J. (2005). Reconsolidation after remembering an odor-reward association requires NMDA receptors. *Learn. Mem.* 12(1): 18-22.

Touzani K. et Sclafani A. (2005). Critical role of amygdala in flavor but not taste preference learning in rats. *Eur. J. Neurosci.* 22(7): 1767-1774.

Tronel S. et Sara S.J. (2002). Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learn. Mem.* 9(3):105-111.

Tronel S. et Sara S.J. (2003). Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *J. Neurosci.* 23(13): 5472-5476.

Tronel S., Feenstra M.G. et Sara S.J. (2004). Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation. *Learn. Mem.* 11(4): 453-458. [Erratum in *Learn. Mem.* 11(5): 658].

Tucci S., Rada P. et Hernandez L. (1998). Role of glutamate in the amygdala and lateral hypothalamus in conditioned taste aversion. *Brain Res.* 813(1): 44-49.

-V-

Vanderwolf C.H. (2001). The hippocampus as an olfacto-motor mechanism: were the classical anatomists right after all? *Behav. Brain Res.* 127(1-2): 25-47.

Vertes R.P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51(1): 32-58.

Vertes R.P. (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neurosci.* 142(1): 1-20.

-W-

Ward M.T., Oler J.A. et Markus E.J. (1999). Hippocampal dysfunction during aging I: deficits in memory consolidation. *Neurobiol. Aging* 20(4): 363-372.

Ward-Robinson J., Coutureau E., Honey R.C. et Killcross A.S. (2005). Excitotoxic lesions of the entorhinal cortex leave gustatory within-event learning intact. *Behav. Neurosci.* 119(4): 1131-1135.

White N.M. et McDonald R.J. (2002). Multiple parallel memory systems in the brain of the Rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 77: 125-184.

Wilig K.A. et Burwell R.D. (1998). Memory impairment on a delayed non-matching to position task after lesions of perirhinal cortex. *Behav. Neurosci.* 112: 827-838.

Wilkins E.E. et Bernstein I.L. (2006). Conditioning method determines patterns of c-fos expression following novel taste-illness pairing. *Behav. Brain Res.* 169(1): 93-97.

Wilson I.A., Ikonen S., Gureviciene I., McMahan R.W., Gallagher M., Eichenbaum H. et Tanila H. (2004). Cognitive Aging and the Hippocampus: How Old Rats Represent New Environments. *J. of Neurosci.* 24(15): 3870-3878.

Winocur G. (1988). A neuropsychological analysis of memory loss with age. *Neurobiol Aging.* 9(5-6): 487-494.

Wirth S., Ferry B. et Di Scala G. (1998). Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behav. Brain Res.* 91(1-2): 49-59.

Wisden W., Errington M.L., Williams S., Dunnett S.B., Waters C., Hitchcock D., Evan G., Bliss T.V. et Hunt S.P. (1990). Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord. *Neuron* 4(4): 603-614.

Witter M.P., Groenewegen H.J., Lopes da Silva F.H. et Lohman A.H. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog. Neurobiol.* 33(3): 161-253.

Worley P.F., Bhat R.V., Barahan J.M., Erickson C.A., McNaughton B.L. et Barnes C.A. (1993). Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: correlation with long-term enhancement. *J. Neurosci.* 13(11): 4776-4786.

Wright C.I., Wedig M.M., Williams D., Rauch S.L. et Albert M.S. (2006). Novel fearful faces activate the amygdala in healthy young and elderly adults. *Neurobiol. Aging* 27(2): 361-374.

Wyss J.M. (1981). An autoradiographic study of the efferent connections of the entorhinal cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 199(4): 495-512.

-Y-

Yamada Y., Hada Y., Imamura K., Mataga N., Watanabe Y. et Yamamoto M. (1999). Differential expression of immediate early genes, c-fos and zif268, in the visual cortex of young rats: effects of a noradrenergic neurotoxin on their expression. *Neurosci.* 92(2): 473-484.

Yamamoto T., Matsuo R. et Kawamura Y. (1980). Localization of cortical gustatory area in rats and its role in taste discrimination. *J. Neurophysiol.* 44(3): 440-455.

Yamamoto T., Yuyama N., Kato T. et Kawamura Y. (1984a). Gustatory responses of cortical neurons in rats. I. Response characteristics. *J. Neurophysiol.* 51(4): 616-635.

Yamamoto T., Yuyama N., Kato T. et Kawamura Y. (1984b). Gustatory responses of cortical neurons in rats. II. Information processing of taste quality. *J. Neurophysiol.* 53(6): 1356-1369.

Yasoshima Y. et Yamamoto T. (1997). Rat gustatory memory requires protein kinase C activity in the amygdala and cortical gustatory area. *Neuroreport* 8(6): 1363-1367.

Yasoshima Y. et Yamamoto T. (1998). Short-term and long-term excitability changes of the insular cortical neurons after the acquisition of taste aversion learning in behaving rats. *Neurosci.* 84(1): 1-5.

Yasoshima Y., Scott T.R. et Yamamoto T. (2006a). Memory-dependent c-Fos expression in the nucleus accumbens and extended amygdala following the expression of a conditioned taste aversive in the rat. *Neurosci.* 141(1): 35-45.

Yasoshima Y., Sako N., Senba E. et Yamamoto T. (2006b). Acute suppression, but not chronic genetic deficiency, of c-fos gene expression impairs long-term memory in aversive taste learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 103(18): 7106-7111.

Yonemori M., Nishijo H., Uwano T., Tamura R., Furuta I., Kawasaki M., Takashima Y. et Ono T. (2000). Orbital cortex neuronal responses during an odor-based conditioned associative task in rats. *Neurosci.* 95(3): 691-703.

-Z-

Zald D.H. (2003). The human amygdala and the emotional evaluation of sensory stimuli. *Brain Res. Rev.* 41(1): 88-123.

Zinyuk L.E., Datiche F. et Cattarelli M. (2001). Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat. *Behav. Brain Res.* 124: 29-32.

Zola-Morgan S. et Squire L.R. (1986). Memory impairment in monkeys following lesions limited to the hippocampus. *Behav. Neurosci.* 100(2): 155-160.

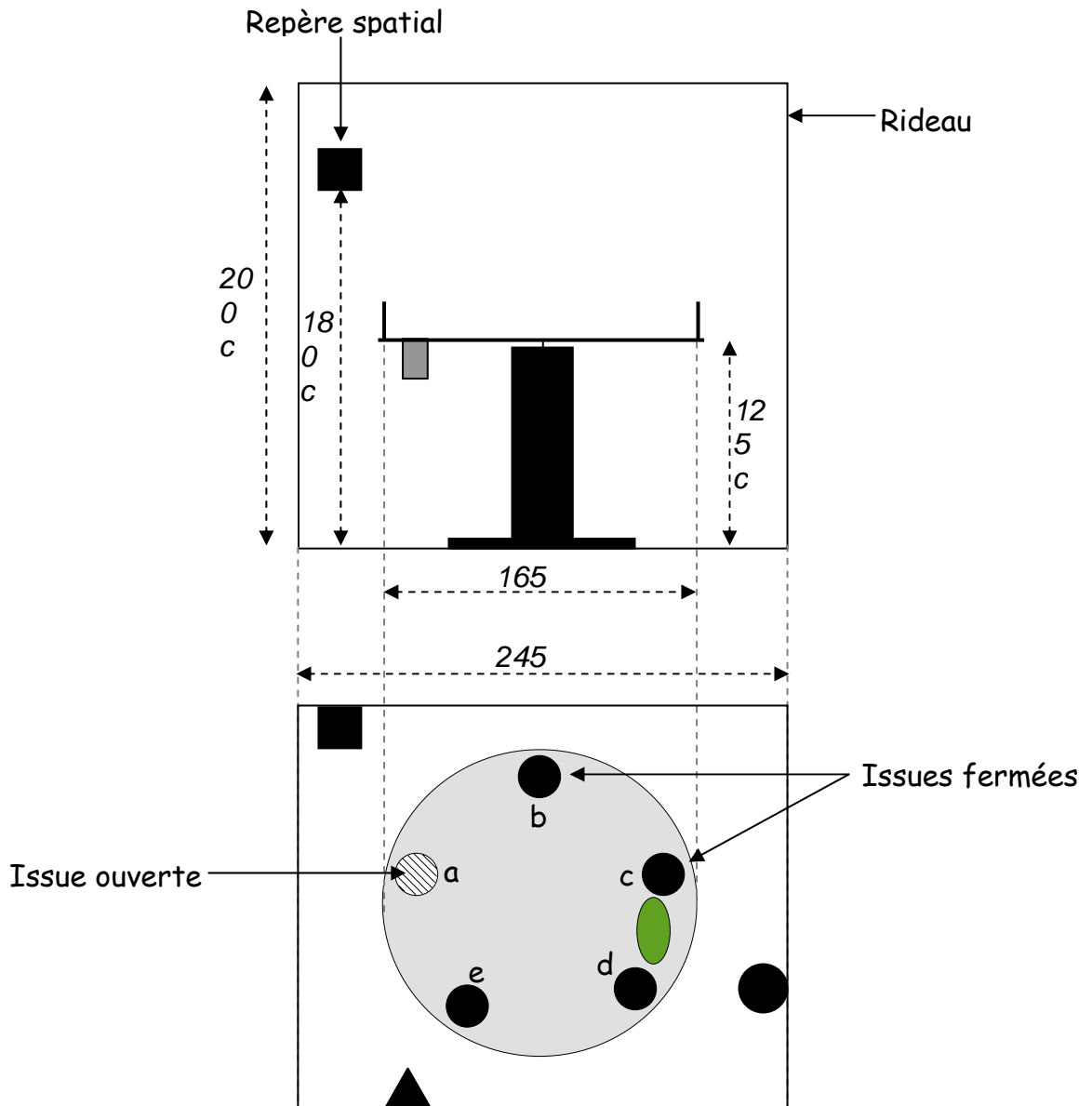
Zornetzer S.F., Thompson R. et Rogers J. (1982). Rapid forgetting in aged rats. *Behav. Neural. Biol.* 36(1): 49-60.

Zyilles K. et Wree A. (1995). Cortex : areal and laminar structure. In *The Rat Nervous System*, Ed G. Paxinos, Academic Press: NY. *Neurobiol Learn Mem.* 2001 May;75(3):245-52.

ANNEXES

ANNEXE 1

Description technique de l'appareillage utilisé pour la tâche de retour au gîte.



ANNEXE 2

Article 1

"Fos and Zif268 expression in the Rat brain in response to olfactory cue after taste-potentiated odor aversion retrieval."

Learning & Memory (2006) 13: 150-160.

ANNEXE 3

Analyses statistiques pour la tâche de reconnaissance d'objet

Ages	T1 Vs T2	A1 Vs A1'	A'' Vs B
Jeunes	t(16)= 4,45 p<0,05	t(16)= 0,87 p=0,39	t(16)= 6,41 p<0,0001
Adultes	t(8)= 0,19 p=0,86	t(8)= 0,48 p=0,64	t(8)=3.01 p<0.05
Sénescents	t(7)=0,25 p=0,81	t(7)=0,62 p=0,55	t(7)=2.96 p<0.05

Tableau A3: Comparaison par un test t apparié de Student pour les trois âges étudiés des temps d'explorations des différents objets. Les différences significatives sont surlignées en gras.

Légendes: **T1**: temps d'exploration totale (objet et enceinte) lors de la première présentation, **T2**: temps d'exploration totale (objet et enceinte) lors de la seconde présentation, **A1**: temps d'exploration de l'objet A1, **A2**: temps d'exploration de l'objet A2, **A''**: temps d'exploration de l'objet A'' et **B**: temps d'exploration de l'objet B

ANNEXE 4

Analyses statistiques pour l'aversion olfactive potentialisée par le goût

A

Rats Jeunes	Habituation Vs Acquisition	Habituation Vs Test	Acquisition Vs Test
Li-O	t(10)=0,84 p=0,42	t(10)=9,43 p<0,0001	t(10)=5,94 p<0,05
Na-O	t(11)=1,53 p=0,15	t(11)=3,83 p<0,05	t(11)=5,94 p<0,05
Li-G	t(10)=1,64 p=0,13	t(10)=17,66 p<0,0001	t(10)=7,47 p<0,0001
Na-G	t(10)=1,31 p=0,22	t(10)=2,77 p<0,05	t(10)=6,75 p<0,0001

B

Rats Adultes	Habituation Vs Acquisition	Habituation Vs Test	Acquisition Vs Test
Li-O	t(6)=2,04 p=0,09	t(6)=7,72 p<0,05	t(6)=3,18 p<0,05
Na-O	t(4)=1,43 p=0,22	t(4)=0,87 p=0,43	t(4)=1,69 p=0,19
Li-G	t(3)=1,31 p=0,28	t(3)=31,34 p<0,0001	t(3)=3,76 p<0,05
Na-G	t(3)=1,48 p=0,24	t(3)=4,77 p<0,05	t(3)=3,9 p<0,05

C

Rats Sénescents	Habituation Vs Acquisition	Habituation Vs Test	Acquisition Vs Test
Li-O	t(6)=2,05 p=0,08	t(6)=7,86 p<0,05	t(6)=4,2 p<0,05
Na-O	t(5)=2,13 p=0,086	t(5)=0,4 p=0,70	t(5)=1,8 p=0,13
Li-G	t(3)=1,04 p=0,37	t(3)=8,14 p<0,05	t(3)=3,61 p<0,05
Na-G	t(1)=0,16 p=0,9	t(1)=2,93 p=0,21	t(1)=2,15 p=0,28

Tableau A6-1: Comparaison du nombre de lapements pour la consommation hydrique de référence, le jour de l'acquisition et le jour du test pour chacun des groupes chez les rats jeunes (A), adultes (B) et sénescents (C). Valeurs du test t apparié de Student, en gras: différences significatives.

A	Acquisition	Rappel
Effet du groupe expérimental	F[1,41]= 1,85 ; p= 0,18	F[1,41]= 191,64 ; p< 0,05
Effet de la stimulation	F[1,41]= 0,79 ; p= 0,79	F[1,41]= 1,86 ; p= 0,18
Interaction entre les facteurs	F[1,41]= 0,43 ; p= 0,43	F[1,41]= 2,38 ; p=0,13
Différences entre les groupes	NS	Li-O ≠ Na-O Li-T ≠ Na-T

B	Acquisition	Rappel
Effet du groupe expérimental	F[1,16]= 2,15 ; p= 0,16	F[1,16]= 174,28 ; p<0,05
Effet de la stimulation	F[1,16]= 0,65 ; p= 0,26	F[1,16]= 17,19 ; p<0,05
Interaction entre les facteurs	F[1,16]= 1,96 ; p= 0,18	F[1,16]= 16,09 ; p<0,05
Différences entre les groupes	NS	Li-O ≠ Na-O Li-T ≠ Na-T

C	Acquisition	Rappel
Effet du groupe expérimental	F[1,15]= 1,14 ; p= 0,3	F[1,15]= 153,95 ; p< 0,05
Effet de la stimulation	F[1,15]= 5,57 ; p= 0,32	F[1,15]= 22,36 ; p<0,05
Interaction entre les facteurs	F[1,15]= 0,06 ; p= 0,81	F[1,15]= 16,62 ; p<0,05
Différences entre les groupes	NS	Li-O ≠ Na-O Li-T ≠ Na-T

Tableau A6-2: Comparaison du nombre de lapements lors de l'acquisition et le jour du test chez les rats jeunes (A), adultes (B) et sénescents (C). Valeurs de l'ANOVA à deux facteurs (le premier facteur étant les groupe expérimental (Li ou Na) et le second étant le stimulus conditionnel (odeur ou goût)), en gras: différences significatives.

ANNEXE 5

Effectifs et Analyses statistiques de l'expression de Fos chez les rats jeunes (1,5 mois).

A	CP	EC	Hipp	BLA	Ce	Med	COF	CPFm	CI
Li	7	7	5	6	7	7	7	6	6
Na	7	7	6	7	7	7	7	4	6
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3

B	CP	EC	Hipp	BLA	Ce	Med	COF	CPFm	CI
Li	8	8	8	7	7	8	8	7	7
Na	7	7	7	6	6	6	7	6	7
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Tableau A7-1 : effectifs des animaux dont nous avons analysé l'expression de Fos suite au rappel de l'AOPG en présence de l'odeur (A) ou du goût (B).

Expression de Fos	Effet du groupe expérimental	Effet de la stimulation	Interaction entre les facteurs	Différences entre les groupes
CPa	F[1,25]= 26,43 ; p<0,05	F[1,25]= 0,45 ; p= 0,51	F[1,25]= 5,72 ; p<0,05	Li-O ≠ Na-O
CPp	F[1,25]= 13,92 ; p<0,05	F[1,25]= 0,85 ; p= 0,36	F[1,25]= 1,28 ; p= 0,27	Li-O ≠ Na-O
CE	F[1,25]= 11,72 ; p<0,05	F[1,25]= 0,16 ; p= 0,69	F[1,25]= 5,32 ; p<0,05	Li-O ≠ Na-O
CA1	F[1,22]= 13,33 ; p<0,05	F[1,22]= 0 ; p= 0,96	F[1,22]= 0,12 ; p= 0,73	Li-O ≠ Na-O Li-G ≠ Na-G
CA3	F[1,22]= 18,82 ; p<0,05	F[1,22]= 0,01 ; p= 0,93	F[1,22]= 0,21 ; p= 0,65	Li-O ≠ Na-O Li-G ≠ Na-G
GD	F[1,22]= 1,2 ; p= 0,2	F[1,22]= 0,69 ; p= 0,57	F[1,22]= 1 ; p= 0,31	NS
BLA	F[1,22]= 13,28 ; p<0,05	F[1,22]= 11,1 ; p<0,05	F[1,22]= 1,15 ; p= 0,29	Li-O ≠ Na-O Li-G ≠ Na-G Li-O ≠ Li-G
Ce	F[1,22]= 0,14 ; p= 0,7	F[1,22]= 0,35 ; p= 0,56	F[1,22]= 0,04 ; p= 0,84	NS
Med	F[1,24]= 1,73 ; p= 0,2	F[1,24]= 1,1 ; p= 0,3	F[1,24]= 3,28 ; p= 0,08	NS
CI	F[1,22]= 7,29 ; p<0,05	F[1,22]= 8,98 ; p<0,05	F[1,22]= 12,98 ; p<0,05	Li-O ≠ Na-O
COF	F[1,25]= 23,59 ; p<0,05	F[1,25]= 9,46 ; p<0,05	F[1,25]= 0 ; p= 0,99	Li-O ≠ Na-O Li-G ≠ Na-G
CPFm	F[1,19]= 10,97 ; p<0,05	F[1,19]= 0,18 ; p= 0,68	F[1,19]= 0,31 ; p= 0,58	Li-O ≠ Na-O Li-G ≠ Na-G

Tableau A7-2 : Comparaison de l'expression de Fos des groupes Li-O, Na-O, Li-G et Na-G chez les rats jeunes par une ANOVA à deux facteurs (le premier étant le groupe expérimental (Li versus Na) et le second le stimulus conditionnel (odeur versus goût)). Valeurs de F pour chacun des facteurs étudiés et pour leurs interactions pour chacune des structures étudiées (en gras : différences significatives).

ANNEXE 6

Article 2

**“Does taste or odor activate the same brain networks after
retrieval of taste potentiated odor aversion?”**

**Accepté pour publication dans *Neurobiology of Learning and
Memory***



Does taste or odor activate the same brain networks after retrieval of taste potentiated odor aversion?

David Dardou ^{a,*}, Frédérique Datiche ^a, Martine Cattarelli ^{b,c}

^a CESG-CNRS UMR 5170, 15 rue H. Picardet, 21000 Dijon, France

^b Université de Lyon, Lyon, F-69373, France

^c Université Lyon 1, EA 3734, Lyon F-69373, France

Received 5 December 2006; revised 4 April 2007; accepted 4 April 2007

Abstract

When simultaneous presentation of odor and taste cues precedes illness, rats acquire robust aversion to both conditioned stimuli. Such a phenomenon referred to as taste-potentiated odor aversion (TPOA) requires information processing from two sensory modalities. Whether similar or different brain networks are activated when TPOA memory is retrieved by either the odor or the taste presentation remains an unsolved question. By means of Fos mapping, we investigated the neuronal substrate underlying TPOA retrieval elicited by either the odor or the taste conditioned stimulus. Whatever the sensory modality used to reactivate TPOA memory, a significant change in Fos expression was observed in the hippocampus, the basolateral nucleus of amygdala and the medial and the orbito-frontal cortices. Moreover, only the odor presentation elicited a significantly higher Fos immunoreactivity in the piriform cortex, the entorhinal cortex and the insular cortex. Lastly, according to the stimulus tested to induce TPOA retrieval, the BLA was differentially activated and a higher Fos expression was induced by the odor than by the taste in this nucleus. The present study indicates that even if they share some brain regions, the cerebral patterns induced by either the odor or the taste are different. Data are discussed in view of the relevance of each conditioned stimulus to reactivate TPOA memory and of the involvement of the different labeled brain areas in information processing and TPOA retrieval.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Taste-potentiated odor aversion; Fos; Retrieval; Memory; Brain mapping; Rat

1. Introduction

Learning to avoid consumption of potentially toxic foods is essential for animal survival. Two major cues—odor and taste—can allow rats to discriminate between dangerous and safe foods. It was shown that odor or taste stimuli can acquire biological significance after having been paired with visceral illness and the aversion to these stimuli will protect against poisoning (Bernstein, 1991). Animals can acquire a strong aversion to a taste conditioned stimulus (CS) which is associated with visceral illness (unconditioned stimulus, US) even if there is a long interval between the CS and the US. In contrast, the association

of an odor with a delayed malaise is more difficult to establish. Nevertheless, the combined presentation of both the odor and the taste paired with visceral malaise leads to a strong aversion to the odor (Palmerino, Rusiniak, & Garcia, 1980). Such an increase in the strength of odor aversion after odor and taste conditioning has been referred to as taste-potentiated odor aversion (TPOA). TPOA is an unusual learning since when a weak stimulus is conditioned with a stronger one, the weak stimulus is expected to be overshadowed. Until now, the mechanisms underlying TPOA have not been clearly elucidated. The potentiation might be explained through three associations: an odor-illness, a taste-illness and an odor–taste association (Durlach & Rescorla, 1980). It can be also assumed that the taste might enhance the odor processing and subsequently might facilitate its association with illness. Garcia, Lasiter,

* Corresponding author. Fax: +33 3 80 68 16 01.
E-mail address: dardou@cesg.cnrs.fr (D. Dardou).

Bermúdez-Rattoni, and Deems (1985) proposed that the taste cue could gate the olfactory information, making it accessible for association with internal malaise. Due to its particular features, such as rapid acquisition (single session), possibility of long intervals between the CS and the US (few minutes to hours) (Bernstein, 1991) and lastly its robustness, TPOA is an interesting model to study the molecular and neuronal mechanisms that subserves the acquisition and the retrieval of sensory information in brain networks.

Several studies have addressed these questions by using lesions of various brain areas. Since different amygdala nuclei receive various inputs, including gustatory, olfactory and visceral afferents (Mc Donald, 1998), their role in aversion has been analyzed extensively. Lesion of the central nucleus of the amygdala (Ce) does not interfere with TPOA learning (Bermúdez-Rattoni, Grijalva, Kiefer, & Garcia, 1986; Hatfield, Graham, & Gallagher, 1992) even if this nucleus could play a role in signaling visceral illness (Tanimoto, Nakagawa, Yamauchi, Minami, & Satoh, 2003). Lesion of the basolateral amygdala nucleus (BLA) impaired TPOA learning (Bermúdez-Rattoni et al., 1986) while leaving the conditioned taste aversion (CTA) intact (Hatfield et al., 1992). Ferry, Sandner, and Di Scala (1995) showed further that a BLA lesion disrupted TPOA acquisition without affecting its retrieval. The BLA has reciprocal connections with the ventro-lateral orbito-frontal cortex (OFC) which could sustain association between predictive cues and outcomes (Saddoris, Gallagher, & Schoenbaum, 2005). Even if an OFC lesion does not impair TPOA acquisition (Lasiter, Deems, & Garcia, 1985), its role in TPOA retrieval remains to be investigated. As the main cortical target of gustatory afferents, the involvement of the insular cortex (IC) in taste aversion was also analyzed (Schafe & Bernstein, 1998; Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000; Koh, Wilkins, & Bernstein, 2003). This structure is not only critically involved in both the learning and the retrieval of CTA memory but its lesion impairs TPOA acquisition (Lasiter et al., 1985). It can be underlined that the IC and the piriform cortex (PCx) are interconnected. The PCx, the main target of the olfactory bulb, is assumed to play a role in odor memory (Haberly & Bower, 1989; Litaudon, Mouly, Sullivan, Gervais, & Cattarelli, 1997; Zinyuk, Datiche, & Cattarelli, 2001). By using Zif268 mapping, our previous data (Dardou, Datiche, & Cattarelli, 2006) suggested that this area could participate in TPOA expression. Olfactory inputs also reach the entorhinal cortex (EC) which is the gateway of information to the hippocampus (Amaral & Witter, 1995). An EC lesion could prolong the duration of the olfactory mnesic trace by controlling the inhibitory activity within the BLA during acquisition of a conditioned odor aversion (Ferry, Wirth, & Di Scala, 1999). Nevertheless, its role in TPOA remains unknown. Despite the number of studies based on various cerebral lesions (Bermúdez-Rattoni et al., 1986; Ferry et al., 1995; Hatfield et al., 1992; Lasiter et al., 1985), the circuits engaged in TPOA expression remain unclear.

The aim of the present study was to investigate if the neuronal circuits underlying TPOA retrieval expression are similar or not, when memory was reactivated by presentation of either the odor or the taste alone. For this purpose we used immunocytochemical detection of Fos which is the product of the immediate early gene *c-fos*. Fos protein is an inducible transcription factor activating various late genes leading to neuronal modifications underlying memory formation (Chaudhuri, Zangenehpour, Rahbar-Dehgan, & Ye, 2000; Guzowski, Setlow, Wagner, & McGaugh, 2001; Herrera & Robertson, 1996; Kaczmarek, 2002). Fos immunocytochemistry is a useful tool to investigate brain activation in various learning paradigms including CTA (Ferreira, Ferry, Meurisse, & Levy, 2006; Navarro, Spray, Cubero, Thiele, & Bernstein, 2000) TPOA (Dardou et al., 2006) and olfactory memory (DaCosta et al., 1997; Datiche et al., 2001). Using this method, we focused our analysis on brain structures such as amygdala nuclei, hippocampus, entorhinal, olfactory, gustatory and frontal cortices, which are assumed to be involved in taste and/or odor information processing.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Thirty five naïve male Sprague–Dawley rats weighing 150–200 g at the beginning of the experiment were used. All rats were treated in accordance with the European Communities council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). They were handled daily for six days in order to acclimate them to the experimenter. The animals were housed in individual cages, under a 12-h light/dark cycle (lights on at 6:00 a.m.). Food and water were given *ad libitum* during this period.

2.2. Test chambers

The rats were habituated to, trained and tested in automated lickometers designed in the laboratory. A lickometer consisted of a Plexiglas cylindrical chamber (24 cm diameter, 40 cm high) allowing observation of the rat behavior during sessions. A drinking tube with a glass spout passing through an oval hole in the Plexiglas wall provided access to water. The cylinder was mounted on a platform with a stainless steel grid floor. A metal wire inside the tube and the steel floor were connected to an electronic device driven by a computer. It allowed us to record the number of licks during a session in the test chambers (Labview, International Instruments). On average, one lick delivered 3.1 μ l of liquid to the rat. On each glass tube, an odorized filter paper could be fixed at 1.5 cm from the aperture of the drinking tube.

2.3. Animal groups

The thirty five rats used were divided into five groups. Four experimental groups were submitted to the TPOA conditioning procedure (Table 1). After simultaneous presentation of an odor and a taste, rats received an i.p. injection of either lithium chloride (Li) or saline solution (Na). Three days later, TPOA retrieval was assessed in the presence of either the conditioned odor (O) or the conditioned taste (T). Thus, the four groups were: Li–O ($n = 8$, weight \pm SEM = 150 g \pm 20), Na–O ($n = 8$, weight \pm SEM = 145 g \pm 15), Li–T ($n = 8$, weight = 149 g \pm SEM = 20), and Na–T ($n = 8$, weight = 160 g \pm SEM = 15). The fifth group consisted of

Table 1

Summary of experimental groups and TPOA conditioning procedures

	Day 1–7	Day 8 (acquisition)	Day 9–10	Day 11 (retrieval)
Li–O Group ($n = 8$)	Habituation	O and T/LiCl	Water	O and water
Na–O Group ($n = 8$)	Habituation	O and T/NaCl	Water	O and water
Li–T Group ($n = 8$)	Habituation	O and T/LiCl	Water	T
Na–T Group ($n = 8$)	Habituation	O and T/NaCl	Water	T
C Group ($n = 3$)				

Odor stimulation (O): benzaldehyde diluted (1/5) in mineral oil. Taste stimulation (T): sodium saccharin (0.1%). Rats of the Li–O and the Li–T groups received an i.p. injection of LiCl (0.2 M; 20 ml/kg) whereas rats from the Na–O and the Na–T groups received an i.p. NaCl injection (0.9%; 20 ml/kg). The home-cage rats (C) were not manipulated. Day 8: TPOA acquisition session; Day 11: retrieval session. The home-cage rats were sacrificed on day 11.

home-cage control animals which had free access to water and were never manipulated (C group, $n = 3$ rats). The C rats allowed us to determine the basal level of Fos expression.

2.4. TPOA conditioning procedure

Two days before the beginning of the experiment, all the rats except the home-cage control animals, were water-deprived. During a seven-day habituation phase, the rats had access to water for 10 min per day in the test chambers. Rats were weighed daily to verify their adaptation to the water deprivation, and the number of licks was recorded during each session. On the eighth day, the rats were submitted to a conditioning trial which consisted of simultaneous presentation of odorized filter paper with 5 μ l of benzaldehyde (Sigma, diluted 1/5 in mineral oil) and of a 0.1% sodium saccharin solution for 10 min in the test chamber. Then they returned to their home-cages. Thirty minutes later, they received an i.p. administration of either lithium chloride (0.2 M, 20 ml/kg) or sodium chloride (0.9%, 20 ml/kg). During the two following days, rats were placed in the test chambers and had access to water for 10 min. On the eleventh day, TPOA retrieval was assessed by a one-bottle test for 10 min. On that day, the fluid intake of each rat was measured by the lickometer. The fluid was either water (Li–O and Na–O groups) in the presence of the conditioned odor (benzaldehyde) or 0.1% sodium saccharin solution (Li–T and Na–T groups) when the conditioned taste was presented alone. The criterion of aversion expression chosen for all the groups was a decrease in the lick number by 30% at least per animal. All the trials were carried out in the middle of the light period (11:00 a.m. to 1:00 p.m.).

2.5. Fos immunocytochemistry

The procedure used in the present study has been previously described (Dardou et al., 2006). Briefly, after having been deeply anaesthetized, animals were sacrificed 90 min after the end of the retrieval session and then perfused transcardially with Ringer lactate containing heparin followed by

an ice-cold fixative. Brains were removed from the skull and transferred in post fixative solution for 12 h. After cryoprotection, the brains were cut coronally (25 μ m) with a cryostat and the sections were collected in phosphate-buffered saline (PBST). Immunocytochemistry was performed on all groups of rats. After elimination of endogenous peroxidase activity, the floating sections were incubated for 60 h at 4 °C in a rabbit anti-*c-fos* antibody (AB-5; Oncogene Science, diluted at 1:5000 in 0.1 M PBST-Az). The sections were placed for 24 h at 4 °C in biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories) diluted 1:1000 in PBST. Then, the sections were incubated for 1 h in avidin-biotin-horseradish peroxidase complex reagent from an ABC Elite kit (Vector Laboratories). Between all steps, sections were rinsed several times with PBST. Lastly, sections reacted with 3–3'-diaminobenzidine (0.02%) and H₂O₂ (0.003%) in 0.05 M Tris–HCl solution (pH 7.6) for 5 min. The reaction was enhanced by adding nickel ammonium sulfate (0.6%) that provided a black staining confined to the nucleus of the labeled cells. Then, the brain sections were rinsed and mounted onto gelatin-coated slides, dehydrated, and coverslipped with DePex for light microscopy. Adjacent sections were counterstained with neutral red in order to delineate the brain structures.

In order to test the specificity of the anti-*c-fos* antibody used, we performed immunohistochemical control. Brain sections were submitted to the protocol described here above except the primary antibody incubation (Fig. 1A). No staining was clearly observed in those brain sections compared to the brain section treated with both the primary and secondary antibodies (Fig. 1B).

2.6. Data analysis

The rat brain atlas of Paxinos & Watson (1986) was used to identify brain areas. The PCx extends from +12.7 mm to +5.7 mm according to the interaural line. This paleocortex can be divided into anterior (PCx-a) and posterior (PCx-p) parts, the boundary between them being at the level of the anterior commissure (+8.7 mm from interaural line). In each rat, we analyzed eight sections taken every 1000 μ m from +12.7 to +5.7 mm

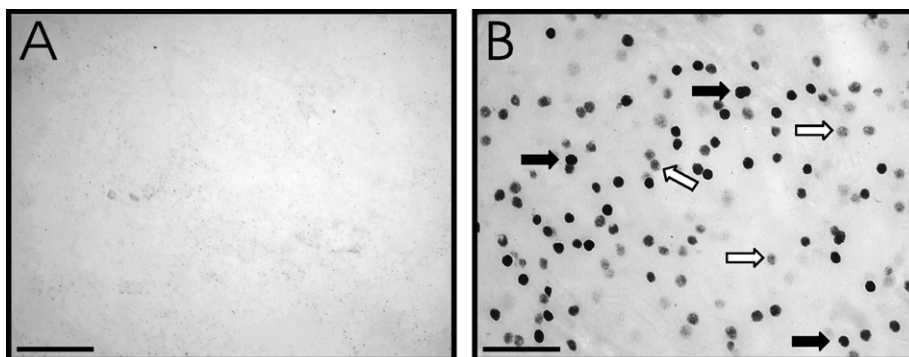


Fig. 1. Microphotograph illustrating the specificity of the *c-fos* antibody used in the present experiment in the orbito-frontal cortex. When brain sections were incubated only with secondary antibody, no Fos expression was noted (A) whereas, with primary and secondary antibody, immunoreactive cells were observed (B). The black arrows indicates cells counted as labelled cells and white arrows, cells not taken into account. Horizontal bar = 100 μ m.

along the whole rostro-caudal PCx extent. We also analyzed Fos expression in the dorsal Hipp (CA1 and CA3) on two coronal sections located at +6.2 and +5.7 mm from the interaural line, respectively. We further counted the labeled cells in the amygdala (BLA, Ce and Med), in the EC, the OFC and the mPFC (infralimbic and prelimbic regions) on sections corresponding to the coronal planes located at +5.7, +4.2, +11.7, +12.7 mm from the interaural line, respectively. Fos immunoreactivity was further analyzed in the gustatory region located in the dysgranular part of the IC (+9.7 mm from the interaural line). The single sections analyzed were representative of the regions examined.

By means of a camera mounted on a Zeiss microscope, the brain sections were scanned via Photoshop software. Automatic quantification of Fos labeled cells was performed using Optilab software. In each section, the detection level (grey scaling) was individually chosen above its background level and the size of the particle detected was adjusted to the average surface of the labelled cells.

Since the piriform cortex, hippocampus and amygdala nuclei are well-delineated regions, labeled cells were counted on the entire extent of these target regions within the selected coronal sections and the data were expressed as mean number of labeled cells per rat. As the borders of the EC and of the neocortical areas (IC, OFC and mPFC) are less easily determined, labeled cells were counted in a sample region located according to the Paxinos and Watson atlas (1986) and data were expressed as a number of labeled cells per mm².

Behavioral data were statistically analyzed by using a two-way ANOVA: one factor was the learning stages (i.e. acquisition versus retrieval) the other one was the solution injected (LiCl/NaCl).

Comparison of Fos labeling between home cage control rats and experimental groups (LiCl-paired and NaCl-paired groups) was performed by a one-way ANOVA followed by a Dunnett test. In addition, in each brain structure considered, we used a two-way ANOVA (one factor being the solution injected (LiCl/NaCl), the other one being the type of sensory stimulus tested (odor/taste)) followed by a Newman–Keuls pairwise comparisons (the significance level chosen was $p < .05$).

3. Results

3.1. Behavioral data

All the rats submitted to TPOA conditioning (Li–O and Li–T) showed a decrease in lick number by 30% at least, according to the criterion of aversion chosen. The two way ANOVA indicated an effect of the treatment used ant the session in O groups (respectively: $F[1,28] = 16.62$; $p < 0.05$ and $F[1,28] = 6.92$; $p < 0.05$) and in T ones (respectively: $F[1,28] = 27.11$; $p < 0.05$ and $F[1,28] = 29.62$; $p < 0.05$), we also noted an interaction of these factor only

in O groups ($F[1,28] = 30.44$; $p < 0.05$). As illustrated, on the acquisition session, the number of licks in the Li–O group was not significantly different compared to the Na–O group (Fig. 2A). Similarly, the number of licks in the Li–T group was not significantly different compared to the Na–T group (Fig. 2B).

When TPOA retrieval was assessed in the presence of the conditioned odor, the number of licks in the Li–O group was significantly ($p < .05$) decreased in comparison with the acquisition session (Fig. 2A). On the contrary, the number of licks was significantly ($p < .05$) increased in the Na–O group from the acquisition to the retrieval session. On the retrieval session, the number of licks was significantly ($p < .05$) lower in the Li–O group compared to the Na–O group.

Similar results were observed when TPOA was retrieved by using the presentation of the taste cue alone (Fig. 2B). In the Li–T, the number of licks was significantly ($p < .05$) decreased on the retrieval session compared to the acquisition one. We noticed also that the lick number was significantly ($p < .05$) increased in the Na–T group on the retrieval session compared to the acquisition one. On the retrieval session, the number of licks in the Li–T group was significantly ($p > .05$) lower in comparison with the Na–T group.

A two way ANOVA (one factor was the treatment used (LiCl versus NaCl), the second was the stimulus used to elicit the retrieval of TPOA (odor versus taste)), further indicated an effect of the treatment used ($F[1, 28] = 16.44$; $p < 0,05$) and an effect of the stimulus ($F[1, 28] = 13,21$; $p < 0,05$) on the number of licks. The decrease in the lick number was significantly ($p < 0.05$) more marked in the Li–T group than the Li–O one (Fig. 2).

3.2. Fos immunocytochemistry

3.2.1. Fos expression in the home-cage control group compared to the experimental groups

When TPOA retrieval was induced by the olfactory stimulus, the one-way ANOVA indicated a significant effect of the group of rats in the PCx-a ($F[2, 14] = 30.87$;

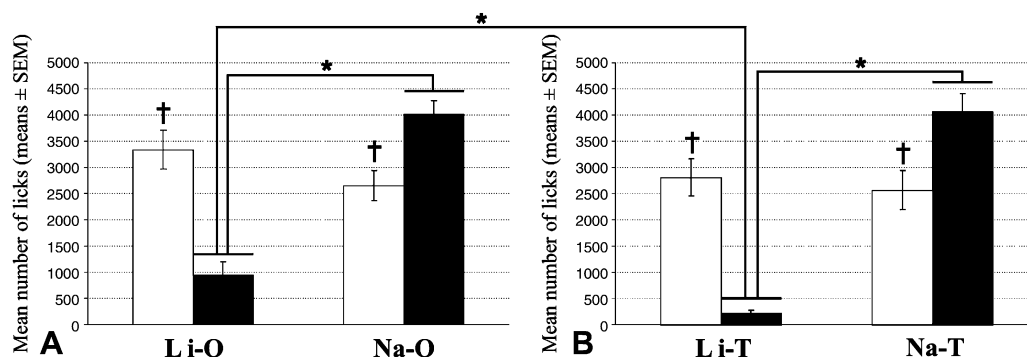


Fig. 2. Mean number of licks during TPOA acquisition (in white) and TPOA retrieval (in black) in the presence of the odor cue in the Li–O and the Na–O groups (A) or of the taste cue in the Li–T and Na–T groups (B). †Significant difference ($p < .05$) in the lick number between the acquisition session and the retrieval session. *Significant difference ($p < .05$) between groups.

$p < .05$), the PCx-p ($F[2, 14] = 11.88$; $p < .05$), the EC ($F[2, 14] = 12.13$, $p < .05$), the hippocampal subdivisions CA1 ($F[2, 11] = 16.33$; $p < .05$) and CA3 ($F[2, 11] = 11.57$; $p < .05$), the BLA ($F[2, 13] = 13.19$; $p < .05$), the Med ($F[2, 14] = 6.37$; $p < .05$), the OFC ($F[2, 14] = 21.56$; $p < .05$), the mPFC ($F[2, 14] = 24.27$; $p < .05$) and the IC ($F[2, 12] = 13.92$; $p < .05$). Post-hoc analysis showed that Fos expression was significantly increased in both the Li–O and the Na–O rats in comparison with the home–cage C rats in the PCx-a, the PCx-p, the BLA, the Med and the OFC. In the EC, the hippocampus, the mPFC and the IC, only the Li–O groups showed a significantly higher number of labelled cells than the C one.

When TPOA retrieval was induced by the taste stimulus, the one-way ANOVA indicated a significant effect of the group of rats in the PCx-a ($F[2, 15] = 44.37$; $p < .05$), the PCx-p ($F[2, 15] = 19.37$; $p < .05$), the EC ($F[2, 15] = 5.24$; $p < .05$), the hippocampal subdivisions CA1 ($F[2, 15] = 4.98$; $p < .05$) and CA3 ($F[2, 15] = 7.96$; $p < .05$), the BLA ($F[2, 13] = 6.99$; $p < .05$), the OFC, ($F[2, 15] = 33.9$; $p < .05$), the mPFC ($F[2, 13] = 5.38$; $p < .05$) and the IC ($F[2, 14] = 10.07$; $p < .05$).

In the PCx-a, the PCx-p, the EC, the BLA, the OFC and the IC, post-hoc analysis showed that Fos expression was significantly increased in both the Li–T and the Na–T groups in comparison with the home–cage C group. In the Hipp and the mPFC, only the Li–T group was more immunoreactive than the C one.

3.2.2. Fos expression according to the experimental groups and the conditioned stimulus

3.2.2.1. Piriform cortex. In the PCx-a, the two-way ANOVA indicated a significant effect of the experimental conditions ($F[1, 25] = 26.43$; $p < .05$), no effect of the sensory stimulus used to elicit retrieval and a significant interaction ($F[1, 25] = 5.72$; $p < .05$). Newman–Keuls pairwise comparisons indicated a significantly higher Fos immunoreactivity in the Li–O compared to the Na–O (Fig. 3A).

In the PCx-p, the two-way ANOVA indicated only a significant effect of the experimental conditions ($F[1, 25] = 13.92$; $p < .05$). The number of Fos labelled cells was significantly increased in the Li–O rats compared to the Na–O rats.

3.2.2.2. Entorhinal cortex. The two-way ANOVA showed a significant effect of the experimental conditions ($F[1, 25] = 11.72$; $p < .05$) and a significant interaction ($F[1, 25] = 5.32$; $p < .05$). As illustrated in the Fig. 3B, Fos expression was significantly higher in the Li–O rats compared to the Na–O ones.

3.2.2.3. Hippocampus. We observed only a significant effect of the experimental conditions in both the CA1 ($F[1, 22] = 13.33$; $p < .05$) and the CA3 ($F[1, 22] = 18.82$; $p < .05$) subdivisions.

In CA1 and CA3, Newman–Keuls pairwise comparisons indicated that Fos immunoreactivity was significantly

higher in the Li–O and the Li–T rats compared to the Na–O and the Na–T ones, respectively (Fig. 3C).

3.2.2.4. Amygdala. In the BLA, the two-way ANOVA showed a significant effect of the experimental conditions ($F[1, 22] = 13.28$; $p < .05$) and the sensory stimulus ($F[1, 22] = 11.10$; $p < .05$). Newman–Keuls pairwise comparisons indicated a significantly higher Fos immunoreactivity in the Li–O and the Li–T rats compared to the Na–O and the Na–T, respectively. Moreover, the Li–O rats were significantly more labelled than the Li–T ones.

In the Ce and the Med, neither the experimental condition nor the sensory stimulus used to elicit TPOA retrieval had a significant effect on Fos expression (Fig. 3D and Fig. 5).

3.2.2.5. Frontal regions. In the orbito-frontal cortex, a significant effect of the experimental conditions ($F[1, 25] = 25.39$; $p < .05$) and a significant effect of the sensory stimulus ($F[1, 25] = 9.46$; $p < .05$) were noted.

Fos immunoreactivity was significantly increased in the Li–O and the Li–T rats compared to the Na–O and the Na–T rats, respectively (Fig. 3E and Fig. 4).

In the medial prefrontal cortex (Fig. 3F), the two-way ANOVA indicated a significant effect of the experimental conditions ($F[1, 19] = 10.97$; $p < .05$). The number of Fos immunoreactive cells was significantly higher in the Li–O and Li–T rats compared to the Na–O and Na–T rats, respectively.

In the insular cortex, the ANOVA indicated a significant effect of the experimental conditions ($F[1, 22] = 7.29$; $p < .05$), a significant effect of the sensory stimulus used to elicit retrieval ($F[1, 22] = 8.98$; $p < .05$) and a significant interaction ($F[1, 22] = 12.98$; $p < .05$). Newman–Keuls pairwise comparisons revealed that the Li–O rats were significantly ($p < .05$) more immunoreactive than the Na–O ones (Fig. 3G).

4. Discussion

The aim of the present study was to investigate the brain activation patterns induced by TPOA retrieval according to the conditioned stimulus tested, i.e. either the odor or the taste alone.

4.1. Technical considerations

In this study, changes in neuronal activity related to memory retrieval were examined by means of Fos immunocytochemical detection which is a widely-used mapping tool (Ferreira et al., 2006; Navarro et al., 2000) but has some limits. The immediate-early gene *c-fos* drives the expression of a number of other genes. Its precise functional role in mnemonic processes remains unknown (Kaczmarek, 2002) and an increased Fos immunoreactivity in a brain area does not necessarily imply a behavioral involvement of this area. However, Fos has been hypothesized to

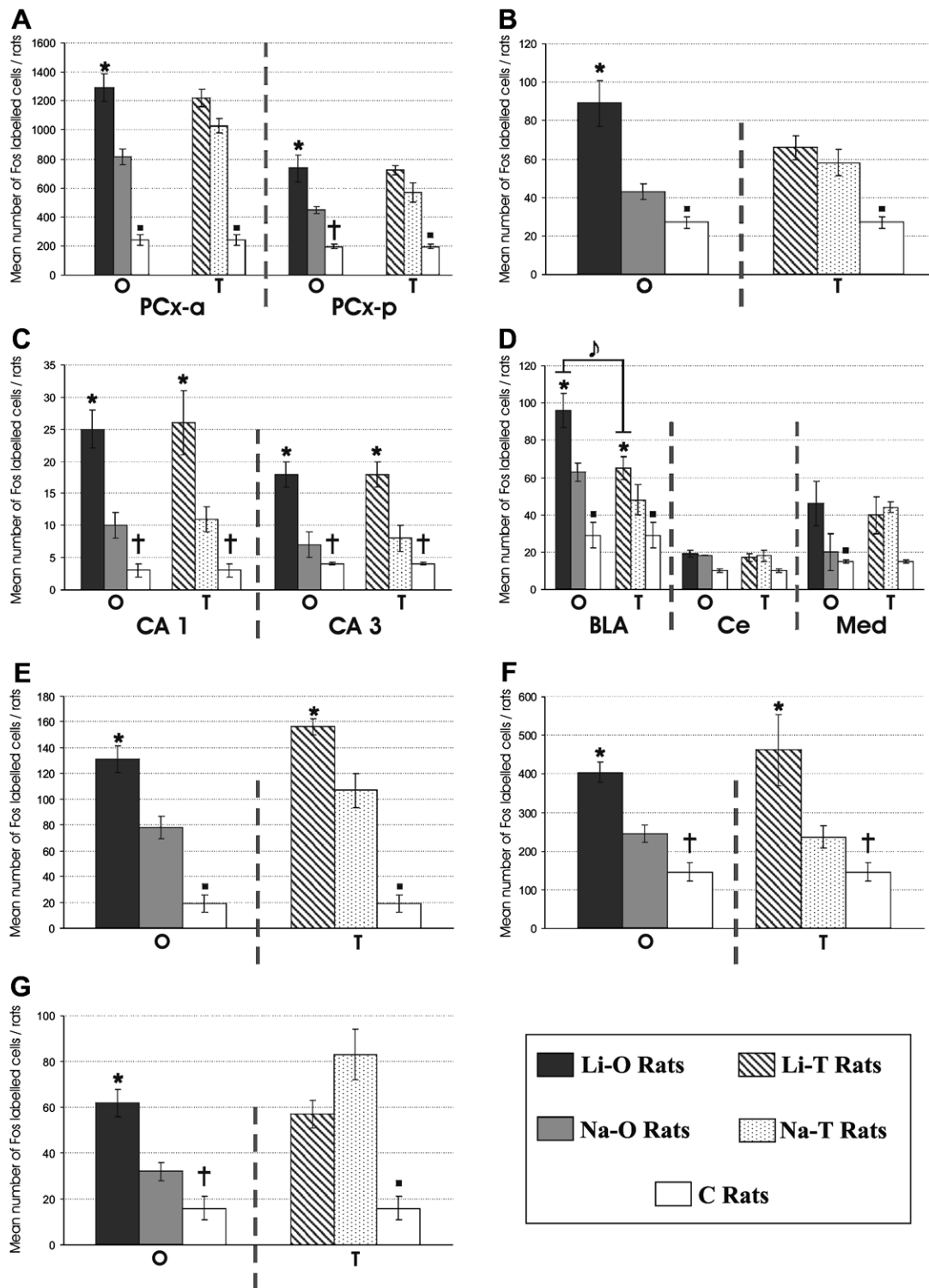


Fig. 3. Histograms showing the number of Fos immunoreactive cells (means \pm SEM) in the brain areas analyzed (A, Piriform cortex; B, Entorhinal cortex; C, Hippocampus; D, Amygdala; E, Orbito-frontal lateral cortex; F, Frontal medial cortex; G, Insular cortex) when presentation of either the odor cue (O) or the taste cue (T) was used to elicit TPOA retrieval. Asterisks (*) indicate a significant difference ($p < .05$). The squares (■) indicate that Fos expression in C rats was significantly different ($p < .05$) from both LiCl and NaCl paired rats and the black cross (†) indicates that Fos expression in C rats was significantly different ($p < .05$) only from the LiCl-paired ones. When comparing the LiCl-paired groups with respect to the sensory cue used for retrieval (either O or T), significant differences are indicated by a ♪ ($p < .05$).

act as a coincidence detector (Kaczmarek, 2002) activated by different signalling pathways and triggered by information such as relevant sensory or emotional cues. Hence, Fos

mapping can point out important information regarding the activated circuitry even if the complete understanding of the role of each activated area requires going one step

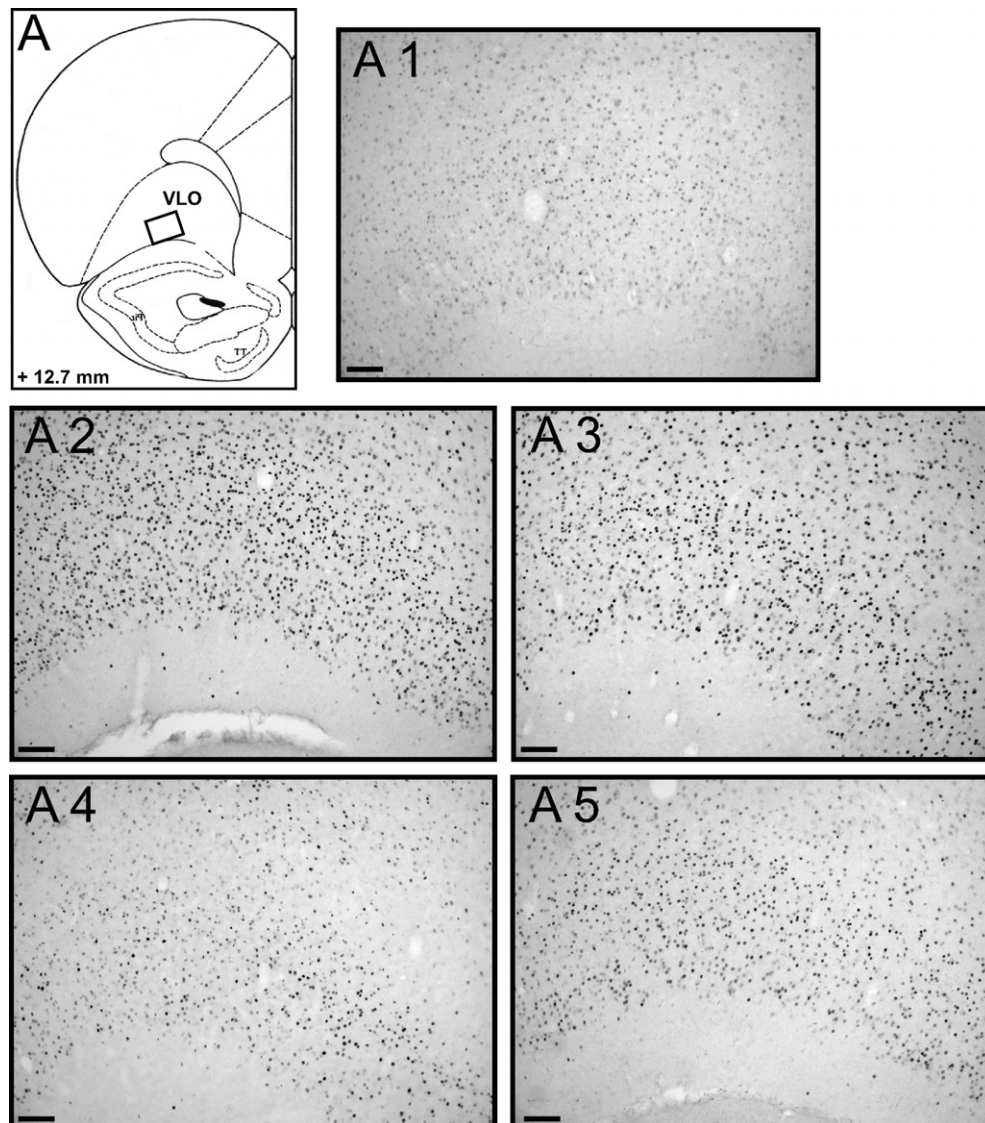


Fig. 4. Fos protein expression after TPOA retrieval in the ventrolateral orbitofrontal cortex (OFC). Schematic section taken from the Paxinos and Watson atlas (1986) showing the location of the counting window (size: 0.15 mm^2) in the OFC (A). Photomicrographs of the VLO (A) illustrating Fos immunoreactivities in Home cage (A1), Li-O (A2), Na-O (A3), Li-T (A4) and Na-T rats (A5). Horizontal bar = $100 \mu\text{m}$.

further by combining several methods such as lesion, reversible inactivation or anti-*c-fos* antisense oligonucleotides. Lastly, we checked also that the specificity of the Fos labeling was no longer observed when immunohistochemistry was performed without the primary antibody.

Our data indicate that the exposure to the odor or to the taste stimulus elicited a wide pattern of activation and the influence of the stimulus strength on Fos labeling cannot be ruled out. Obviously, a similarity between the intensity of the odor and the taste cues used is impossible to reach since they belong to different sensory modalities. Nevertheless, the stimulus intensity can be expected to modify rather the labeled cell number in each brain area than the number of activated areas as observed in the olfactory bulb (Guthrie, Anderson, Leon, & Gall, 1993) or in the auditory system (Saint Marie, Luo, & Ryan, 1999). Consequently, even if the difference in Fos labeling according to the stimulus

tested should be cautiously considered, the brain circuits activated either by the odor or the taste cue seem reliable.

In typical retrieval experiments, as in the present experiment, the CS is given without the US but such a protocol can result in extinction (Eisenberg, Kobil, Berman, & Dudai, 2003). We checked the TPOA behavioral extinction and noted that it needed several days (data not shown), which is in agreement with Bernstein's (1991) results demonstrating the robustness of aversion memory which requires several successive trials to be extinguished. Thus, the brain patterns of activation observed in the present experiment can be assumed to result from TPOA retrieval.

In agreement with previous data (Dardou et al., 2006), all the rats receiving lithium chloride injection 30 min after simultaneous presentation of odor and taste displayed a strong aversion to both the conditioned cues. It is noticeable that the presentation of an odor alone followed

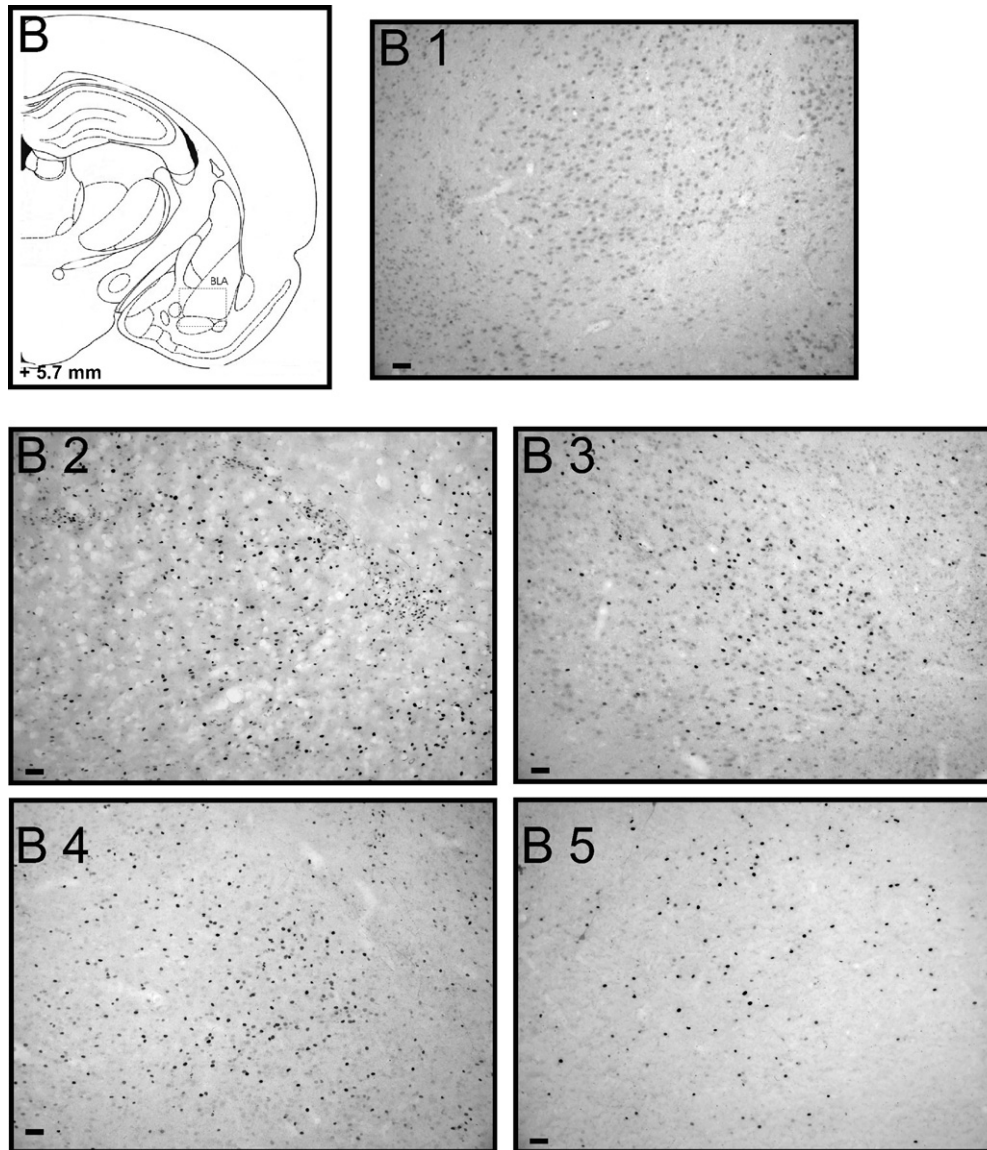


Fig. 5. Fos protein expression after TPOA retrieval in the BLA. Schematic section taken from the *Paxinos and Watson atlas (1986)* showing the location of the BLA. Photomicrographs of the BLA (B) showing Fos immunoreactivities in the C (B1), Li-O (B2), Na-O (B3), Li-T (B4) and Na-T (B5) rats. Horizontal bar = 100 μm .

30 min later by lithium chloride injection, did not succeed in inducing an aversive behavior towards this odor (Dardou et al., 2006; Durlach & Rescorla, 1980; Ferry et al., 1995; Ferry & Di Scala, 1997; Inui, Shimura, & Yamamoto, 2006; Lasiter et al., 1985; Palmerino et al., 1980; Rusiniak, Palmerino, & Garcia, 1982). As we observed a strong aversion to either the odor or the taste cue in the experiment reported here, the rats are assumed to develop TPOA.

In a previous experiment (Dardou et al., 2006) we verified that a LiCl injection alone did not exert any significant influence on Fos expression when the rats were tested two days later. Fos expression induced by thirst has been checked (Datiche, Rouillet, & Cattarelli, 2001) and did not induce any significant difference between water-restricted control rats and control rats with water *ad libitum*. Moreover, water restriction has been shown to

modify Fos immunoreactivity in a few hypothalamic nuclei only (for a review: Rowland, 1998).

Lastly, a discrepancy between the numbers of Fos labeled cells is noted between the present results and those previously observed (Dardou et al., 2006). Some areas, i.e. PCx, Hipp, BLA, Ce, exhibited similar amounts of Fos labeled cells in both experiments. However, in the present experiment, the EC, the OFC and the IC showed a lower level of Fos expression whereas the mPFC was more labeled than in the past experiment. It is noticeable that these variations in Fos labeling were observed in both the Li-O and in the Na-O groups. The main other differences between these two experiments were the odorous stimulus (benzaldehyde versus geraniol) and the rat strain (Sprague-Dawley versus Wistar) choices. These changes were made in order to optimize the experiments, after having

checked (data not shown), using the same TPOA protocol as described here above, that the Sprague–Dawley rats were more aversive towards the benzaldehyde stimulus than the Wistar rats towards either the benzaldehyde or the geraniol stimulus. These changes in experimental protocols might account for the differences noted in the results. Moreover, it can be mentioned that the pattern of activation differed between both the experiments, mainly at the level of the PCx, the EC and the mPFC. In the PCx, even if the Li–O rats were more labeled than the Na–O rats in both experiments, the difference did not reach the level of significance chosen in the past experiment, as it did now. In the EC, the ratio of the Fos-labeled cell number between the Li–O and the Na–O groups was reversed between the two experiments, the Na–O rats being more labeled than the Li–O rats in the past experiments. Even if no argument can be put forward to explain this difference, it might be related to the behavioral differences between rat strains and a difference in the sensitivity of sensory information processing might be hypothesized (Andrews, 1996). Lastly, it can be noted that in the present experiment, the mPFC included not only the infralimbic cortex as before but also the prelimbic cortex, this difference could account for the larger number of Fos labeled cells reported here.

4.2. Brain activation patterns elicited by TPOA retrieval induced by either the odor or the taste cue

Compared to the home–cage control rats, the Fos labeling was significantly increased in the PCx-a, the BLA, the Med, and the OFC in the Na–O group, and in the PCx-a, the PCx-p, the EC, the BLA, the OFC, and the IC in the Na–T group, indicating sensory information processing itself. In a majority of the brain regions investigated, Fos expression was also significantly increased in both the Li–O and the Li–T groups compared to the home–cage control group, in agreement with previous experiments (Dardou et al., 2006). Moreover, in most of the areas considered, the Fos expression in the LiCl-paired group differed significantly from the one in the NaCl-paired group, which indicates that besides sensory information processing, these areas are also involved in TPOA retrieval. Whatever the sensory modality tested to reactivate TPOA memory, a significant change in Fos expression was noticed in some regions: the hippocampus, the amygdala basolateral nucleus, and the medial and the orbito-frontal cortices. However, the major finding was that the cerebral patterns induced by either the odor or the taste, are different: only the odor cue elicited a significantly higher Fos expression in the piriform (PCx-a and PCx-p), the entorhinal and the insular cortices. Moreover, a differential activation of the BLA was also noted, the odor cue inducing a significantly higher Fos expression than the taste cue.

The common brain network activated by the odor or the taste cues during TPOA retrieval includes areas known to participate in olfactory or gustatory information processing as well as in integrative functions. The hippocampus is

involved in the formation of a conditioned odor aversion (Miller, Nonneman, Kelly, Neisewander, & Isaac, 1986) and TPOA is enhanced when the hippocampal activity is reduced by a cholinergic antagonist (Bermúdez-Rattoni, Coburn, Fernandez, Chavez, & Garcia, 1987). Our results complete these data and sustain the involvement of the Hipp in TPOA retrieval elicited by either the olfactory or the taste cue. Stone, Grimes, & Katz (2005) suggested that hippocampal memory processes might interfere with mechanisms underlying taste aversion memory. The Hipp receives only little information from the gustatory cortex but its amygdala connections might sustain functional interactions and in particular, reactivation of previously acquired aversive events (Alvarez & Ruarte, 2004). It might be hypothesized that the presentation of the conditioned taste cue could reactivate aversion memory linked to the hippocampal olfactory cue representation. The BLA which receives olfactory, gustatory and visceral inputs (Mc Donald, 1998; Pitkänen, Savander, & LeDoux, 1997) has a key position to participate in aversion processes by encoding flavor cues and by processing flavor memories in view of their post-ingestive consequences (Touzani & Sclafani, 2005). Several lesion studies evidenced the role of the BLA in TPOA acquisition (Bermúdez-Rattoni et al., 1987; Ferry et al., 1995; Inui et al., 2006) but not in its retrieval (Ferry et al., 1995). In contrast, our experiment indicates a BLA involvement in TPOA retrieval. Methodological differences, i.e. Fos mapping versus pharmacological treatment (Ferry et al., 1995), could account for such data discrepancy. Reciprocal connections between the BLA and the orbitofrontal area could support a network sustaining the use of incentive information in order to guide behavior (Saddoris et al., 2005). Both the orbitofrontal and the medial prefrontal cortices participate in TPOA retrieval whatever the conditioned cue used. In the OFC, taste and olfactory inputs converge onto the same neurons, thus forming representations of flavour (Rolls, 2001). The OFC lesion has been shown to impair an odor–taste association (Sakai & Imada, 2003) without disrupting TPOA acquisition (Lasiter et al., 1985). The mPFC is assumed to play a role in consolidation of olfactory long-term memory (Broad, Hinton, Keverne, & Kendrick, 2002; Tronel & Sara, 2003) as well as in retrieval of a conditioned taste aversion (Hernadi et al., 2000). Our data extend these studies since the mPFC is shown to participate in TPOA retrieval. Moreover, both the mPFC and the OFC are involved in higher-order multimodal sensory integration (Schoenbaum, Chiba, & Gallagher, 2000) and decision-making. As they are involved in the integration of taste and odor stimuli into a flavor percept in collaboration with the insular cortex (Touzani & Sclafani, 2005), their activation might reflect their involvement in the reactivation of an odor–taste association during TPOA retrieval and in the elaboration of an adequate response whatever the conditioned sensory cue.

Besides this common brain network involved in TPOA retrieval, the piriform, the entorhinal and the insular cortices showed a significant modification of Fos expression only

when the odor was used to elicit TPOA retrieval. The PCx is involved not only in olfactory information processing but also in multimodal sensory integration (Schoenbaum & Eichenbaum, 1995; Zinyuk et al., 2001). Its involvement in odor-induced TPOA retrieval could result from its role (particularly in its posterior part) in olfactory memory (Litaudon et al., 1997; Mouly & Gervais, 2002; Roman, Staubli, & Lynch, 1987; Zinyuk et al., 2001). The PCx is interconnected to the entorhinal cortex which belongs to the primary olfactory cortex (Haberly & Price, 1978) and is considered as the gateway of olfactory information to the hippocampus (Amaral & Witter, 1995). The olfactory cue processing at the EC level can be differentially modulated by the internal nutritional state (Chabaud et al., 2000). Furthermore, the EC plays a role in olfactory learning and memory (Kaut, Bunsey, & Riccio, 2003) and its lesion facilitates learning of a conditioned odor aversion by lengthening the olfactory trace duration and renders it tolerant to an extended inter-stimulus interval (Ferry, Oberling, Jarrard, & Di Scala, 1996; Wirth, Ferry, & Di Scala, 1998). In accordance with these studies, our finding strengthens the assumption of a role of the EC in processing biologically salient odor signals. The connections of both the PCx and the EC to the amygdala (Pitkänen et al., 1997) could account for the differential BLA activation in the LiCl-injected rats where the conditioned odor exposure elicited a significantly higher Fos expression than the conditioned taste one. The role of the amygdala can differ according to the aversive paradigms (Bahar, Dorfman, & Dudai, 2004), and to the stimulus biological meaning in olfactory cue processing (Sevelinges, Gervais, Messaoudi, Granjon, & Mouly, 2004). The strongest BLA activation elicited by the olfactory cue might reflect the acquired relevance of the odor since potentiation of the odor by the taste happens in TPOA. The insular cortex is the main cortical target of gustatory inputs (Nakashima et al., 2000). We noted that the Na–T rats exhibited a high Fos expression which could reflect the gustatory cue processing according to its palatability and the amount of sensory information processed, which was larger than in the Li–T group, due to the preference phenomenon (Sclafani & Ackr-off, 2003) as noted by the increased lick number on the retrieval day. The IC plays a key role in conditioned taste aversion (Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000; Koh & Bernstein, 2005; Lasiter et al., 1985; Schafe & Bernstein, 1998). However, its role in TPOA remains a matter of debate. A lesion of its anterior part impaired TPOA acquisition (Lasiter et al., 1985) whereas an IC lesion disrupted neither the acquisition nor the retention of TPOA (Kiefer, Rusiniak, & Garcia, 1982). In a TPOA paradigm, the insular lesion impaired acquisition of the taste aversion whereas the odor aversion was only slightly attenuated (Inui et al., 2006). As underlined by Touzani & Sclafani (2005), the flavor percept could result from the interaction of several cortical areas. The insular cortex receives olfactory information and its connections with the piriform cortex (Datiche & Cattarelli, 1996) could subsequently account for the Fos expression observed in the Li–O rats.

In conclusion, the Hipp, the BLA, the OFC and the mPFC which showed an increased Fos expression whatever the conditioned stimulus, might constitute a network involved in the odor–taste association and the cue integration into a flavor percept. This assembly of connected regions might sustain the reactivation of a TPOA memory trace and the exposure to either the one or the other stimulus could elicit the reactivation of the whole network which will lead to the elaboration of a specific withdrawal behavioral response. Nevertheless, other areas seemed mainly involved in the odor-induced TPOA retrieval. The PCx and the EC are known for their roles in olfactory information processing and memory, the IC receives olfactory inputs even if it is considered as the gustatory cortex. Moreover, a differential activation was noted in the BLA according to the cue used to elicit TPOA retrieval. This result could account for the potentiation of the olfactory cue by the taste which is involved in TPOA. Future experiments using functional methods will be required to determine the precise respective role of these cerebral areas in processing odor or taste as retrieval cues of aversive memory.

Acknowledgments

The authors are grateful to Prof. S. Thornton for his helpful assistance with English. We also thank M. Rossé and M. Tavan for their helpful assistance with the lickometer. D. Dardou is a recipient of a grant from the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MNERT).

References

- Alvarez, E. O., & Ruarte, B. R. (2004). Glutamic acid and histamine-sensitive neurons in the ventral hippocampus and the basolateral amygdala of the rat: Functional interaction on memory and learning processes. *Behavioral Brain Research*, *152*, 209–219.
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1995). Hippocampal formation. In G. Paxinos (Ed.), *The rat nervous system* (pp. 443–493). London: Academic Press.
- Andrews, J. S. (1996). Possible confounding influence of strain, age and gender on cognitive performance in rats. *Cognition Brain Research*, *3*, 251–267.
- Bahar, A., Dorfman, N., & Dudai, Y. (2004). Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *European Journal of Neuroscience*, *19*, 1115–1118.
- Bermúdez-Rattoni, F., Coburn, K. L., Fernandez, J., Chavez, A. F., & Garcia, J. (1987). Potentiation of odor by taste and odor aversions in rats are regulated by cholinergic activity of dorsal hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *26*, 553–559.
- Bermúdez-Rattoni, F., Grijalva, C. V., Kiefer, S. W., & Garcia, J. (1986). Flavor-illness aversions: The role of amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiology and Behavior*, *38*, 503–508.
- Bernstein, I. L. (1991). Flavor aversion. In T. V. Getchell (Ed.), *Smell and taste in health and disease* (pp. 417–428). New York: Raven Press.
- Broad, K. D., Hinton, M. R., Keverne, E. B., & Kendrick, K. M. (2002). Involvement of the medial prefrontal cortex in mediating behavioural responses to odour cues rather than olfactory recognition memory. *Neuroscience*, *114*, 715–729.

- Chabaud, P., Ravel, N., Wilson, D. A., Mouly, A.-M., Vigouroux, M., Farget, V., et al. (2000). Exposure to behaviourally relevant odour reveals differential characteristics in rat central olfactory pathways as studied through oscillatory activities. *Chemical Senses*, *25*, 561–573.
- Chaudhuri, A., Zangenehpour, S., Rahbar-Dehgan, R., & Ye, F. (2000). Molecular maps of neural activity and quiescence. *Acta Neurobiologica experimentalis*, *60*, 403–410.
- Da Costa, A. P. C., Broad, K. D., & Kendrick, K. M. (1997). Olfactory memory and maternal behaviour-induced changes in c-fos and zif/268 mRNA expression in the sheep brain. *Molecular Brain Research*, *46*, 63–73.
- Dardou, D., Datiche, F., & Cattarelli, M. (2006). FOS & ZIF268 expression in the Rat brain in response to olfactory cue after taste-potentiated odor aversion retrieval. *Learning & Memory*, *13*, 150–160.
- Datiche, F., & Cattarelli, M. (1996). Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the Rat: A tracing study using the B subunit of the cholera toxin. *Brain Research Bulletin*, *41*, 391–398.
- Datiche, F., Rouillet, F., & Cattarelli, M. (2001). Expression of Fos in the piriform cortex after acquisition of olfactory learning: An immunohistochemical study in the rat. *Brain Research Bulletin*, *55*, 95–99.
- Durlach, P. J., & Rescorla, R. A. (1980). Potentiation rather than overshadowing in flavor-aversion learning: An analysis in terms of within-compound associations. *Journal of Experimental Psychology and Animal Behavior Processes*, *6*, 175–187.
- Eisenberg, M., Kobil, T., Berman, D. E., & Dudai, Y. (2003). Stability of retrieved memory: Inverse correlation with trace dominance. *Science*, *301*, 1102–1104.
- Escobar, M. L., & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Research*, *852*, 208–212.
- Ferreira, G., Ferry, B., Meurisse, M., & Levy, F. (2006). Forebrain structures specifically activated by conditioned taste aversion. *Behavioral Neuroscience*, *120*, 952–962.
- Ferry, B., & Di Scala, G. (1997). Bicuculine administration into basolateral amygdala facilitates trace conditioning of odor aversion in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, *67*, 80–83.
- Ferry, B., Oberling, P., Jarrard, L. E., & Di Scala, G. (1996). Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behavioral Neuroscience*, *110*, 443–450.
- Ferry, B., Sandner, G., & Di Scala, G. (1995). Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste-potentiated odor aversion. *Neurobiology of Learning and Memory*, *64*, 169–180.
- Ferry, B., Wirth, S., & Di Scala, G. (1999). Functional interaction between entorhinal cortex and basolateral amygdala during trace conditioning of odor aversion in the Rat. *Behavioral Neuroscience*, *113*, 118–125.
- Garcia, J., Lasiter, P. S., Bermúdez-Rattoni, F., & Deems, D. A. (1985). A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Science*, *443*, 8–21.
- Guthrie, K. M., Anderson, A. J., Leon, M., & Gall, C. (1993). Odor-induced increases in c-fos mRNA expression reveal an anatomical “unit” for odor processing in olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*, 3329–3333.
- Guzowski, J. F., Setlow, B., Wagner, E. K., & McGaugh, J. L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: A comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos and zif268. *Journal of Neuroscience*, *21*, 5089–5098.
- Haberly, L. B., & Bower, J. (1989). Olfactory cortex: Model circuit for study of associative memory? *Trends in Neuroscience*, *12*, 258–264.
- Haberly, L. B., & Price, J. L. (1978). Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, *178*, 711–740.
- Hatfield, T., Graham, P. W., & Gallagher, M. (1992). Taste-potentiated odor aversion learning: Role of the amygdaloid basolateral complex and central nucleus. *Behavioral Neuroscience*, *106*, 286–293.
- Hernadi, I., Karadi, Z., Vigh, J., Petyko, Z., Egyed, R., Berta, B., et al. (2000). Alterations of conditioned taste aversion after microinjection of neurotoxins in the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Research Bulletin*, *53*, 751–758.
- Herrera, D. G., & Robertson, H. A. (1996). Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology*, *83*, 83–107.
- Inui, T., Shimura, T., & Yamamoto, T. (2006). Effects of brain lesions on taste-potentiated odor aversion in rats. *Behavioral Neuroscience*, *120*, 590–599.
- Kaczmarek, L. (2002). c-Fos in learning: Beyond the mapping of neuronal activity. In L. Kaczmarek & H. J. Herrera (Eds.). *Handbook of chemical neuroanatomy: IEG and inducible transcription factors of the central nervous system function and dysfunction* (Vol. 19, pp. 189–215). Elsevier Science.
- Kaut, K. P., Bunsey, M. D., & Riccio, D. C. (2003). Olfactory learning and memory impairments following lesions to the hippocampus and perirhinal-entorhinal cortex. *Behavioral Neuroscience*, *117*, 304–319.
- Kiefer, S. W., Rusiniak, K. W., & Garcia, J. (1982). Flavor illness aversions: Gustatory neocortex ablations disrupt taste but not taste-potentiated odor cues. *Journal of Comparative Psychology*, *4*, 540–548.
- Koh, M. T., & Bernstein, I. L. (2005). Mapping conditioned taste aversion associations using c-Fos reveals a dynamic role for insular cortex. *Behavioral Neuroscience*, *119*, 388–398.
- Koh, M. T., Wilkins, E. E., & Bernstein, I. L. (2003). Novel tastes elevate c-fos expression in the central amygdala and insular cortex: Implication for taste aversion learning. *Behavioral Neuroscience*, *117*, 1416–1422.
- Lasiter, P. S., Deems, D. A., & Garcia, J. (1985). Involvement of the anterior insular gustatory neocortex in the taste-potentiated odor aversion learning. *Physiology and Behavior*, *34*, 71–77.
- Litaudon, P., Mouly, G., Sullivan, R., Gervais, R., & Cattarelli, M. (1997). Learning-induced changes in rat piriform cortex activity mapped using multisite recording with voltage sensitive dye. *European Journal of Neuroscience*, *9*, 1593–1602.
- McDonald, A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, *55*, 257–332.
- Miller, J. S., Nonneman, A. J., Kelly, K. S., Neisewander, J. L., & Isaac, W. L. (1986). Disruption of neophobia, conditioned odor aversion and conditioned taste aversion in rats with hippocampal lesions. *Behavioral and Neural Biology*, *45*, 240–253.
- Mouly, A. M., & Gervais, R. (2002). Polysynaptic potentiation at different levels of rat olfactory pathways following learning. *Learning & Memory*, *9*, 66–75.
- Nakashima, M., Uemura, M., Yasui, K., Ozaki, H. S., Tabata, S., & Taen, A. (2000). An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: Distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex. *Neuroscience Research*, *36*, 297–309.
- Navarro, M., Spray, K. J., Cubero, I., Thiele, T. E., & Bernstein, I. L. (2000). c-fos induction during conditioned taste aversion expression varies with the aversion strength. *Brain Research*, *887*, 450–453.
- Palmerino, C. C., Rusiniak, K. W., & Garcia, J. (1980). Flavor-illness aversions: The peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science*, *208*, 753–755.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney: Academic Press.
- Pitkänen, A., Savander, V., & LeDoux, J. E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences*, *20*, 517–523.
- Rolls, E. T. (2001). The rules of formation of the olfactory representations found in the orbitofrontal cortex olfactory areas in primates. *Chemical Senses*, *26*, 595–604.

- Roman, F., Staubli, U., & Lynch, G. (1987). Evidence for synaptic potentiation in a cortical network during learning. *Brain Research*, *418*, 221–226.
- Rowland, N. E. (1998). Brain mechanisms of mammalian fluid homeostasis: Insights from use of immediate early gene mapping. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *23*, 49–63.
- Rusiniak, K. W., Palmerino, C. C., & Garcia, J. (1982). Potentiation of odor by taste in rats: Tests of some nonassociative factors. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, *96*, 775–780.
- Saddoris, M. P., Gallagher, M., & Schoenbaum, G. (2005). Rapid associative encoding in basolateral amygdala depends on connections with orbitofrontal cortex. *Neuron*, *46*, 321–331.
- Saint Marie, R. L., Luo, L., & Ryan, A. F. (1999). Effects of stimulus frequency and intensity on c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem. *The Journal of Comparative Neurology*, *404*, 258–270.
- Sakai, N., & Imada, S. (2003). Bilateral lesions of the insular cortex or of the prefrontal cortex block the association between taste and odor in the rat. *Neurobiology Learning & Memory*, *80*, 24–31.
- Schafe, G. E., & Bernstein, I. L. (1998). Forebrain contribution to the induction of a brainstem correlate of conditioned taste aversion: II. *The Insular (gustatory) Cortex*. *Brain Research*, *800*, 40–47.
- Schoenbaum, G., Chiba, A. A., & Gallagher, M. (2000). Changes in functional connectivity in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during learning and reversal training. *Journal of Neuroscience*, *20*, 5179–5189.
- Schoenbaum, G., & Eichenbaum, H. (1995). Information coding in the rodent prefrontal cortex. I. Single-neuron activity in orbitofrontal cortex compared with that in pyriform cortex. *Journal of Neurophysiology*, *74*, 733–750.
- Sclafani, A., & Ackroff, K. (2003). Reinforcement value of sucrose measured by progressive ratio operant licking in the rat. *Physiology and Behavior*, *79*, 663–670.
- 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. *Learning & Memory*, *11*, 761–769.
- Stone, M. E., Grimes, B. S., & Katz, D. B. (2005). Hippocampal inactivation enhances taste learning. *Learning & Memory*, *12*, 579–586.
- Tanimoto, S., Nakagawa, T., Yamauchi, Y., Minami, M., & Satoh, M. (2003). Differential contributions of the basolateral and central nuclei of the amygdala in the negative affective component of chemical somatic and visceral pains in rats. *European Journal of Neuroscience*, *18*, 2343–2350.
- Touzani, K., & Sclafani, A. (2005). Critical role of amygdala in flavor but not taste preference learning in rats. *European Journal of Neuroscience*, *22*, 1767–1774.
- Tronel, S., & Sara, S. J. (2003). Blockade of NMDA receptors in prefrontal cortex induces an enduring amnesia for odor–reward associative learning. *Journal of Neuroscience*, *23*, 5472–5476.
- Wirth, S., Ferry, B., & Di Scala, G. (1998). Facilitation of olfactory recognition by lateral entorhinal cortex lesion in rats. *Behavioral Brain Research*, *91*, 49–59.
- Zinyuk, L. E., Datiche, F., & Cattarelli, M. (2001). Cell activity in the anterior piriform cortex during an olfactory learning in the rat. *Behavioral Brain Research*, *124*, 29–32.

ANNEXE 7

Effectifs et Analyses statistiques de l'expression de Zif268 chez les rats jeunes (1,5 mois).

A	CP	CE	Hipp	BLA	Ce	Med	COF	CPFm	CI
Li	6	4	6	5	5	6	6	5	5
Na	7	6	7	5	5	5	7	5	6
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3

B	CP	CE	Hipp	BLA	Ce	Med	COF	CPFm	CI
Li	7	7	7	7	7	7	7	5	7
Na	7	6	7	6	6	6	7	5	7
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Tableau A9-1 : effectifs des animaux dont nous avons analysé l'expression de Zif268 suite au rappel de l'AOPG en présence de l'odeur (A) ou du goût (B).

Expression de Zif268	Effet du groupe expérimental	Effet de la stimulation	Interaction entre les facteurs	Différences entre les groupes
CPa	F[1,23]= 18,66 p<0,05	F[1,23]= 2,57 p= 0,12	F[1,23]= 6,02 p<0,05	Li-O ≠ Na-O Li-O ≠ Li-G
CPp	F[1,23]= 10,07 p<0,05	F[1,23]= 15,39 p<0,05	F[1,23]= 0,30 p= 0,59	Li-O ≠ Li-G
CE	F[1,19]= 1,97 p= 0,18	F[1,19]= 1,06 p= 0,31	F[1,19]= 0 p= 0,95	NS
CA1	F[1,23]= 1,74 p= 0,19	F[1,23]= 4,02 p= 0,06	F[1,23]= 0,77 p= 0,39	NS
CA3	F[1,23]= 3,70 p= 0,07	F[1,23]= 0 p= 0,99	F[1,23]= 3,58 p= 0,068	NS
GD	F[1,23]= 3,70 p= 0,072	F[1,23]= 1,12 p= 0,3	F[1,23]= 2,07 p= 0,16	NS
BLA	F[1,19]= 33,26 p<0,05	F[1,19]= 4,97 p<0,05	F[1,19]= 5,04 p<0,05	Li-O ≠ Na-O Li-G ≠ Na-G Li-O ≠ Li-G
Ce	F[1,19]= 9,64 p<0,05	F[1,19]= 12,4 p<0,05	F[1,19]= 7,82 p<0,05	Li-O ≠ Na-O Li-O ≠ Li-G
Med	F[1,20]= 4,27 p<0,05	F[1,20]= 0,82 p= 0,37	F[1,20]= 5,69 p<0,05	Li-O ≠ Na-O
CI	F[1,20]= 11,59 p<0,05	F[1,20]= 31,58 p<0,05	F[1,20]= 2,4 p= 0,14	Li-O ≠ Na-O Li-O ≠ Li-G Na-O ≠ Na-G
COF	F[1,23]= 4,22 p= 0,055	F[1,23]= 9,68 p<0,05	F[1,23]= 4,74 p<0,05	Li-O ≠ Na-O Li-O ≠ Li-G
CPFm	F[1,16]= 1,85 p= 0,2	F[1,16]= 1,02 p= 0,35	F[1,16]= 0,05 p= 0,85	NS

Tableau A9-2 : Comparaison de l'expression de Zif268 des groupes Li-O, Na-O, Li-G et Na-G chez les rats jeunes par une ANOVA à deux facteurs (le premier étant le groupe expérimental (Li versus Na) et le second le stimulus conditionnel (odeur versus goût)). Valeurs de F pour chacun des facteurs étudiés et pour leurs interactions pour chacune des structures étudiées (en gras : différences significatives).

ANNEXE 8

Effectifs et Analyses statistiques de l'expression de Fos chez les rats adultes (12-13 mois).

A	CP	CE	Hipp	BLA	Ce	Med	COF	CPFm	CI
Li	6	6	5	6	6	4	6	7	6
Na	5	4	5	4	4	4	5	5	4
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3

B	CP	CE	Hipp	BLA	Ce	Med	COF	CPFm	CI
Li	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Na	4	4	4	4	4	4	4	4	4
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3

Tableau A10-1 : effectifs des animaux dont nous avons analysé l'expression de Fos suite au rappel de l'AOPG en présence de l'odeur (A) ou du goût (B).

Expression de Zif268	Effet du groupe expérimental	Effet de la stimulation	Interaction entre les facteurs	Différences entre les groupes
CPa	F[1,15]= 7,52 p<0,05	F[1,15]= 2,44 p= 0,14	F[1,15]= 1,91 p= 0,19	Li-O ≠ Na-O
CPp	F[1,15]= 6,7 p<0,05	F[1,15]= 0,52 p= 0,48	F[1,15]= 1,7 p= 0,21	Li-O ≠ Na-O
CE	F[1,14]= 0,4 p= 0,54	F[1,14]= 1,47 p= 0,25	F[1,14]= 0,05 p= 0,82	NS
CA1	F[1,14]= 17,09 p<0,05	F[1,14]= 10,53 p<0,05	F[1,14]= 3,43 p= 0,08	Li-O ≠ Na-O Li-G ≠ Na-G Na-O ≠ Na-G
CA3	F[1,14]= 18,11 p<0,05	F[1,14]= 5,29 p<0,05	F[1,14]= 14,48 p<0,05	Li-O ≠ Na-O Li-O ≠ Li-G
GD	F[1,14]= 21,36 p<0,05	F[1,14]= 6,36 p<0,05	F[1,14]= 18,08 p<0,05	Li-O ≠ Na-O Li-O ≠ Li-G
BLA	F[1,14]= 38,19 p<0,05	F[1,14]= 1,23 p= 0,28	F[1,14]= 0,83 p= 0,38	Li-O ≠ Na-O Li-G ≠ Na-G
Ce	F[1,14]= 2,02 p= 0,18	F[1,14]= 0,67 p= 0,43	F[1,14]= 1,49 p= 0,24	NS
Med	F[1,12]= 2,88 p= 0,08	F[1,12]= 0,25 p= 0,63	F[1,12]= 0,61 p= 0,45	NS
CI	F[1,14]= 11,98 p<0,05	F[1,14]= 3,11 p= 0,09	F[1,14]= 22,46 p<0,05	Li-O ≠ Na-O Li-O ≠ Li-G
COF	F[1,15]= 8,28 p<0,05	F[1,15]= 1,51 p= 0,24	F[1,15]= 0,6 p= 0,45	Li-O ≠ Na-O
CPFm	F[1,16]= 0,15 p= 0,7	F[1,16]= 0,39 p= 0,54	F[1,16]= 0,34 p= 0,57	NS

Tableau A10-2 : Comparaison de l'expression de Fos des groupes Li-O, Na-O, Li-G et Na-G chez les rats jeunes par une ANOVA à deux facteurs (le premier étant le groupe expérimental (Li versus Na) et le second le stimulus conditionnel (odeur versus goût)). Valeurs de F pour chacun des facteurs étudiés et pour leurs interactions pour chacune des structures étudiées (en gras : différences significatives).

ANNEXE 9

Effectifs et Analyses statistiques de l'expression de Zif268 chez les rats adultes (12-13 mois).

A	CP	CE	Hipp	BLA	Ce	Med	COF	CPFm	CI
Li	6	5	5	4	5	4	6	7	5
Na	5	5	5	3	3	4	5	5	5
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3

B	CP	CE	Hipp	BLA	Ce	Med	COF	CPFm	CI
Li	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Na	4	4	4	4	4	4	4	4	4
C	3	3	2	3	3	3	3	3	3

Tableau A11-1 : effectifs des animaux dont nous avons analysé l'expression de Zif268 suite au rappel de l'AOPG en présence de l'odeur (A) ou du goût (B).

Expression de Zif268	Effet du groupe expérimental	Effet de la stimulation	Interaction entre les facteurs	Différences entre les groupes
CPa	F[1,15]= 1,92 p= 0,18	F[1,15]= 1,90 p= 0,19	F[1,15]= 0 p= 0,99	NS
CPp	F[1,15]= 0,31 p= 0,58	F[1,15]= 0,17 p= 0,69	F[1,15]= 0,18 p= 0,68	NS
CE	F[1,13]= 0,17 p= 0,69	F[1,13]= 0,09 p= 0,77	F[1,13]= 0,39 p= 0,54	NS
CA1	F[1,13]= 5,91 p<0,05	F[1,13]= 0,2 p= 0,66	F[1,13]= 0,87 p= 0,37	Li-G ≠ Na-G
CA3	F[1,13]= 2,09 p= 0,17	F[1,13]= 1,51 p= 0,24	F[1,13]= 0,01 p= 0,92	NS
GD	F[1,13]= 3,75 p= 0,07	F[1,13]= 3,86 p= 0,07	F[1,13]= 0,07 p= 0,79	NS
BLA	F[1,11]= 178,22 p<0,05	F[1,11]= 75,65 p<0,05	F[1,11]= 43,96 p<0,05	Li-O ≠ Na-O Li-G ≠ Na-G Na-O ≠ Na-G
Ce	F[1,12]= 142,52 p<0,05	F[1,12]= 69,71 p<0,05	F[1,12]= 130,74 p<0,05	Li-O ≠ Na-O Li-O ≠ Li-G
Med	F[1,11]= 22,53 p<0,05	F[1,11]= 34,52 p<0,05	F[1,11]= 9,19 p<0,05	Li-G ≠ Na-G Li-G ≠ Li-O
CI	F[1,14]= 11,49 p<0,05	F[1,14]= 3,32 p= 0,09	F[1,14]= 1,46 p= 0,25	Li-O ≠ Na-O
COF	F[1,15]= 7,82 p<0,05	F[1,15]= 1,22 p= 0,29	F[1,15]= 1,21 p= 0,29	Li-G ≠ Na-G
CPFm	F[1,16]= 2,7 p= 0,12	F[1,16]= 0,01 p= 0,94	F[1,16]= 2,63 p= 0,086	NS

Tableau A11-2 : Comparaison de l'expression de Zif268 des groupes Li-O, Na-O, Li-G et Na-G chez les rats jeunes par une ANOVA à deux facteurs (le premier étant le groupe expérimental (Li versus Na) et le second le stimulus conditionnel (odeur versus goût)). Valeurs de F pour chacun des facteurs étudiés et pour leurs interactions pour chacune des structures étudiées (en gras : différences significatives).

ANNEXE 10

Effectifs des rats Sénescents (20-24 mois).

A	CP	CE	Hipp	BLA	Ce	Med	COF	CPFm	CI
Li	6	6	6	5	5	5	6	6	6
Na	5	4	3	4	5	5	5	4	5
C	4	4	3	4	4	4	4	3	4

B	CP	CE	Hipp	BLA	Ce	Med*	COF	CPFm	CI
Li	6	4	4	3	3	1	6	4	6
Na	4	3	2	3	3	1	4	2	3
C	3	3	2	3	3	3	3	3	3

Tableau A12-1 : effectifs des animaux dont nous avons analysé l'expression de Fos (A) et de Zif268 (B) suite au rappel de l'AOPG en présence de l'odeur.

* : du fait d'un faible effectif dans le Med, nous n'avons pas procédé à une analyse statistique pour cette région.

L'AVERSION OLFACTIVE POTENTIALISEE PAR LE GOUT AU COURS DU VIEILLISSEMENT CHEZ LE RAT: ETUDE COMPORTEMENTALE ET IMMUNOCYTOCHIMIQUE.

Notre travail de thèse analyse, par des approches comportementales et neuro-anatomique, l'impact du vieillissement sur le processus d'aversion olfactive potentialisée par le goût (AOPG). Des rats jeunes, adultes et sénescents sont soumis à l'acquisition et au rappel de cet apprentissage. Tous les rats sont capables d'acquérir et de se rappeler cet apprentissage, même si on note une altération, en fonction de l'âge, de leurs capacités cognitives évaluées par trois tâches différentes. Les expressions de Fos et de Zif268, après rappel de l'AOPG, mettent en évidence des patterns d'activation cérébrale différents en fonction du stimulus (odeur ou goût) utilisé pour le rappel et qui, de plus, évoluent avec l'âge. Ce travail nous a permis de proposer un modèle fonctionnel de l'AOPG.

Mots clés: aversion olfactive potentialisée par le goût, vieillissement, apprentissage, rappel, comportement, Fos, Zif268, immunocytochimie, déficits cognitifs.



TASTE POTENTIATED ODOR AVERSION DURING NORMAL AGEING IN THE RAT: A BEHAVIORAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL STUDY.

In the present work we analysed the effect of normal ageing on taste potentiated odour aversion (TPOA) by using behavioural and functional methods. To this aim, young, adults and old rats were submitted to TPOA conditioning. All the rats learned and recalled this learning in spite of some cognitive deficits observed during three others different learning tests. By using Fos and Zif268 immunochemistry, we noted that the neural substrates activated by TPOA retrieval differed according to the cue (odour or taste) used to induce this retrieval. We also showed that these brain networks changed with the age of animals. In conclusion of this thesis work we proposed a functional model of brain network sustaining TPOA retrieval.

Key words: taste potentiated odor aversion, normal ageing, learning, retrieval, behaviour, Fos, Zif268, immunocytochemistry, cognitive deficits.