



Les comportements préalables à la prise lactée chez le souriceau : caractérisation de sécrétions maternelles réactogènes et implication de l'expérience néonatale

Syrina Al Aïn

► To cite this version:

Syrina Al Aïn. Les comportements préalables à la prise lactée chez le souriceau : caractérisation de sécrétions maternelles réactogènes et implication de l'expérience néonatale. Psychologie. Université de Bourgogne, 2012. Français. ⟨NNT : 2012DIJOS085⟩. ⟨tel-00920664⟩

HAL Id: tel-00920664

<https://theses.hal.science/tel-00920664v1>

Submitted on 19 Dec 2013

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.



HAL Authorization



UNIVERSITE DE BOURGOGNE

UFR Science de la Vie, de la Terre et de l'Environnement

Ecole Doctorale Environnements - Santé

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de : Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Science Vie

Présenté par Syrina AL AÏN

18 décembre 2012

Les comportements préalables à la prise lactée chez le souriceau:
Caractérisation de sécrétions maternelles réactogènes et
implication de l'expérience néonatale

Membres du Jury :

Frédéric LEVY	Directeur de Recherches, INRA, Tours	Rapporteur
Marie TRABALON	Professeur, Université de Rennes 1	Rapporteur
Gilles GHEUSI	Maître de Conférences, Institut Pasteur, Paris	Examineur
Bruno PATRIS	Ingénieur de Recherches, CNRS, Dijon	Co-directeur de thèse
Benoist SCHAAL	Directeur de Recherches, CNRS, Dijon	Directeur de thèse

Vis comme si tu devais mourir demain, apprend comme si tu devais vivre toujours. - Mohandas Karamchand Ghandhi

Choisissez un travail que vous aimez et vous n'aurez pas à travailler un seul jour de votre vie. - Conficius

REMERCIEMENTS

Je souhaite exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes que j'ai côtoyées et qui ont contribué de près ou de loin à mon travail de thèse.

En premier lieu, je souhaite remercier les financeurs de cette thèse, la *Région Bourgogne* et le *CNRS*, qui ont accordé leur confiance à ce projet.

Mes remerciements vont, à présent, au Directeur du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Mr. *Luc Pénicaud*, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions.

Ensuite, j'adresse mes remerciements chaleureux à mes directeurs de thèse, Mr. *Benoist Schaal* et Mr. *Bruno Patris*. A Benoist, pour son enthousiasme sans fin, sa soif intarissable de savoirs et son envie de transmettre ses connaissances aux autres. Nos échanges toujours captivants et enrichissants et votre motivation contagieuse ont « nourri/alimenté mon esprit », attisé ma curiosité intellectuelle et m'ont amenée à me surpasser! A Bruno, pour son aide constante, sa grande disponibilité, ses nombreux conseils et encouragements. Merci pour le temps que tu m'as consacré, aussi bien pour des questions scientifiques que personnelles. Je garde d'excellents souvenirs de nos excursions en congrès, notamment devant la Maison Blanche ! Merci à vous deux d'avoir cru en moi et de m'avoir donné la chance de « grandir » scientifiquement à vos côtés pendant ces trois années. Vous m'avez rendue plus riche de savoirs, et cela n'a pas de prix !

Je tiens à remercier les rapporteurs et l'examineur de cette thèse, *Marie Trabalon*, *Frédéric Lévy* et *Gilles Gheusi* pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Vos remarques lors de ma soutenance m'ont énormément touchée et ont impulsé une énergie nouvelle dans ma recherche active de post-doctorat aux Etats-Unis. Merci pour votre gentillesse et vos compliments à l'égard de mon travail.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance envers les membres de mon jury de suivi de thèse *Jorge Gallego*, *Christophe Féron* et *Gérard Coureaud*, qui ont suivi l'avancée de mon travail et permis d'éclaircir et d'approfondir nos questions de recherche. Je vous remercie pour votre implication et votre bienveillance au cours de mon doctorat et lors de ma recherche de post-doctorat.

Merci à l'équipe 7 pour les échanges instructifs et sympathiques que nous avons pu avoir: *Gérard Coureaud*, *Jean-Yves Baudouin*, *Karine Durand*, *Sylviane Martin* et *Véronique Boulanger*. Merci à *Ornella Godard* pour son écoute, sa compréhension et sa bonne humeur! *Sébastien Romagny* pour nos discussions toujours de grande qualité, aussi bien sérieuses que (surtout) superficielles ! Tu as l'étoffe d'un grand chercheur, alors à toi de jouer ! Bonne route !

Un énorme merci aux cinq stagiaires avec qui j'ai réalisé toutes les manips au cours de ces 3 années: *Amal Chraïti*, *Laurine Belin*, *Mathieu Mingioni* et *Camille Goudet*. Merci pour votre gentillesse, votre rigueur, votre curiosité et votre disponibilité au cours de nos longues soirées et week-ends de manips ! Vous avez été des stagiaires en Or ! J'espère que cette expérience a renforcé votre passion et votre motivation et que vous réaliserez vos rêves professionnels !

Un grand merci à *Anne Lefranc*, responsable de l'animalerie, pour son attention permanente à l'égard des animaux, pour son aide dans certaines expériences, ses conseils pertinents, et sa grande humanité.

Xavier Grosmaître et *Marije Oostinjer* avec qui j'ai collaboré sur un projet annexe étudiant des souris transgéniques. Je garde un excellent souvenir de cette collaboration qui m'a ouvert l'esprit et qui m'a beaucoup enrichi.

Lionel Maillot, *Candice Chaillou*, et *Élise Cellier-Holzem* qui m'ont intégrée dans la joyeuse et ludique aventure de l'*Experimentarium*. Merci de nous diriger avec autant de passion et de patience dans une ambiance aussi conviviale que stimulante ! Ce fut une expérience extrêmement enrichissante, gratifiante et épanouissante. Je n'ai qu'une chose à dire : Vive les gants oranges et longue vie à l'Expé !

Un énorme MERCI à mes « collègues » de bureau (thésards ou post-doctorants) : *Rachel Charra-Jourda* pour sa force de caractère et son courage. *Hélène Loos* pour son écoute et sa grande gentillesse ! *Vonimihaingo Ramarason* pour sa bonne humeur toujours constante et ses merveilleuses gousses de vanille de Madagascar ! *Nanette Schneider* pour ses éclats de rire et sa simplicité ! *Jungsoo Son* pour sa délicatesse, sa douceur, et son self-control à toute épreuve !

Je remercie tout particulièrement *Carole Sester*, collègue de bureau et surtout amie, qui m'a accompagnée et soutenue tout au long de ces trois années. J'ai énormément apprécié ton énergie, ton optimisme, ta force de caractère, ton extrême gentillesse et ton altruisme ! Ce fut un plaisir de travailler à tes côtés Carole ! J'ai tellement de souvenirs qui me viennent pêle-mêle à l'esprit, des événements, des lieux de voyages, des soirées en tous genres et de belles émotions. Merci d'avoir été là pour vivre tous ces moments inoubliables et riches en émotions ; celles qui donnent de la saveur à la vie ! Je te souhaite, de tout cœur, de briller et de t'épanouir dans tes nouvelles aventures Versaillaises ! Allons de l'avant maintenant ! Et n'oublie pas New York - Paris, ça se fait bien !!

Beaux moments de joie et d'amitié également partagés avec *Coralie Biguzzi*, à qui j'exprime toute mon affection. Fille pétillante, le sourire aux lèvres, les éclats de rire aussi légendaires que sonores ! Merci pour ta gentillesse, ta joie de vivre et ton dynamisme. Tu as illuminé nos soirées avec tes talents de cuisinière, de danseuse infatigable et de bonne vivante ! Toi qui adore les voyages, tu sais que ma porte te sera toujours ouverte !

Merci aux stagiaires, doctorants et post-doctorants que j'ai pu côtoyer :

Camille Allard qui a été à mes côtés au cours de ces trois ans de thèse et avec qui j'ai partagé tant de bons moments à Dijon et à Vienne/Lyon ! Bon vent Camille, et rendez-vous peut-être à mi-chemin entre Chicago et New York !! *Xavier Brenachot* pour son art de la fête ! *Alexandra Gouazé* pour sa rock attitude et son énergie, tu as mis de la vie au Centre ! *Audrey Filézac de l'Etang* pour avoir été là et pour m'avoir aussi bien comprise à des moments importants de ma vie. *Aude-Reine Noël*, femme forte, digne, spirituelle, attentive et manipulant l'autodérision et l'humour à merveille ! Tu es une personne d'esprit et d'action à la fois, et c'est vraiment admirable ! Je te souhaite bonne route sur les chemins de l'Asie. *Bénédictte Noyon* pour sa force de caractère et ses encouragements constants pour trouver un post-doc ou pour apprendre à parler anglais au « café Polyglotte » ! Bon courage pour la suite, ta persévérance va payer ! *Amélie Pécourt* pour les soirées partagées et notre magnifique voyage au Canada : Mémorable ! Merci pour ta simplicité et ta sincérité ! *Cédric Serrano* pour ta serviabilité, ta disponibilité et ton humour. Tu es, en prime, un réalisateur hors-pair, un fêtard infatigable et un super papa ! Bref, un véritable pilier dans le Centre ! *Michel Tavan* pour avoir confectionné avec délicatesse et savoir-faire tous les dispositifs de nos manip. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité ! Et bravo pour la qualité de ton jeu au badminton et de tes blagues !

A mes amis chez qui j'allais me ressourcer et partager des moments privilégiés, indispensables pour garder un équilibre : *Caro & Jérôme, Carole, Cindy, Cathe, Auré, Sandra, Maud, Nelly, Jennyfer et Guillaume.*

J'adresse ma plus profonde reconnaissance à mes parents qui m'ont permis de réaliser ce rêve, qui m'ont soutenue malgré les difficultés et les doutes. Merci à mon père pour m'avoir transmis sa force de caractère et sa détermination et à ma mère pour sa bienveillance et sa grande culture. J'espère que vous êtes fiers de moi !

A ma *mamy* pour toutes ses connaissances transmises, sa bienveillance et sa dévotion. Toi qui as toujours cru en moi. Ambitieuse, tu disais...J'aurais tellement aimé que tu sois à mes côtés pour voir le chemin parcouru. Merci !

A *Julien* qui m'a permis de terminer cette thèse dans les meilleures conditions. Ta philosophie de vie m'a été d'un grand soutien ! Merci pour ta patience et ta compréhension, ton écoute et tes conseils raisonnés.

En résumé, ces trois années de thèse ont été une expérience intensément riche sur les plans professionnel et personnel. En un mot : Inoubliable ! Cette période reste, à ce jour, mes trois plus belles années...

TABLE DES MATIERES

I) Introduction Générale : La régulation olfactive des réponses adaptatives chez le nouveau-né mammifère	1
1) Généralités	3
2) La communication chimique chez les rongeurs	6
2.1) Sources odorantes	6
2.2) Effets physiologiques et comportementaux des stimulations odorantes	7
3) Organisation de la relation mère-jeunes chez la souris	8
3.1) Physiologie de la reproduction et comportements maternels chez la souris	8
3.2) Transitions développementales du souriceau	10
4) Communication chimique impliquée dans la relation mère-jeunes chez les rongeurs	15
4.1) Des odeurs mammaires qui induisent la saisie de la tétine	15
4.2) Mécanismes sensoriels et cognitifs néonataux impliqués dans l'initiation de la tétée	16
5) Objectifs de recherche	19
5.1) Choix du modèle biologique	19
5.2) Objectifs de la recherche	20
II) Les comportements néonataux vis-à-vis de la tétine : Recherche de substrats odorants maternels attractifs et appétitifs pour le souriceau nouveau-né	23
1) Caractérisation des substrats olfactifs qui guident le souriceau (5-6 jours) vers la femelle allaitante	25
1.1) Introduction	25
1.2) Orientation of newborn mice to lactating females: Identifying biological substrates of semiochemical interest	26
1.3) Conclusion	45
2) Nature des substrats olfactifs qui déclenchent la saisie orale de la tétine chez le souriceau à la naissance	46
2.1) Introduction	46
2.2) How does a newly born mouse get to the nipple? Odor substrates eliciting first nipple grasping and sucking responses	47
2.3) Conclusion	67
3) Apprentissages olfactifs associés au contexte de tétée chez le souriceau	68
3.1) Introduction	68
3.2) An exploratory study of nursing-related odor learning in mouse pups on the 1 st postnatal day	69
3.3) Conclusion	82

III) Facteurs temporels dans l'émission d'indices odorants par la mère et leur perception par les nouveau-nés	85
1) Sélectivité des souriceaux en développement face aux odeurs de laits d'âges lactationnels différents	89
1.1) Introduction	89
1.2) An odor timer in milk? Synchrony in the odor of milk effluvium and neonatal chemosensation in the mouse	90
1.3) Conclusion	104
2) Sélectivité des souriceaux à la naissance face aux odeurs de laits d'âges lactationnels différents	105
2.1) Introduction	105
2.2) The initial response of newly born mice to the odors of murine colostrum and milk: Unconditionally attractive, but conditionally discriminated	106
2.3) Conclusion	123
3) Sélectivité des souriceaux face aux odeurs de laits et de tétines de femelles d'une autre souche	124
3.1) Introduction	124
3.2) Réponses néonatales envers l'odeur de laits de la souche C57BL/6 prélevés à différents stades de la lactation	125
3.3) Réponses néonatales envers des tétines de femelles allaitantes (BALB/c et C57BL/6) à différentes périodes de lactation	130
3.4) Discussion	135
3.5) Conclusion	137
IV) Discussion Générale et Perspectives	139
1) Substrats olfactifs émis par la femelle allaitante et reactogènes chez le nouveau-né	141
1.1) La femelle allaitante : Généralement attractive	141
1.2) La nature de substrats olfactifs maternels actifs	142
2) Identification des processus psychobiologiques qui interviennent dans le comportement de tétée	148
2.1) Stimuli inducteur de la première tétée chez la souris	149
2.2) Stimuli inducteurs du comportement de tétée après expérience néonatale	150
2.3) Présence d'un signal olfactif chez la souris?	151
3) Covariation entre propriétés sensorielles du lait murin et préférence olfactive du souriceau	152
4) Perspectives	156
V) Références Bibliographiques	161
VI) Annexes	185

**I) INTRODUCTION GENERALE : LA REGULATION
OLFACTIVE DES REPONSES ADAPTATIVES CHEZ
LE NOUVEAU-NE MAMMIFERE**

1) GENERALITES

La **naissance constitue une étape critique** de la reproduction des Mammifères. Le fœtus est alors transféré d'un environnement stable et protecteur (chaud, hydratant, nutritif), dans un univers aux caractéristiques nettement instables et hostiles. L'organisme nouveau-né doit alors **opérer des changements physiologiques et comportementaux pour s'adapter efficacement à ce nouveau milieu** à la fois asséchant, variable dans son impact sensoriel (température, contacts physiques et intensité des stimulations), et exposé à des risques accrus de morbidité et de mortalité (agents infectieux, prédation, homophagie). Pour sa survie immédiate, le nouveau-né doit surtout s'assurer, par sa réactivité physiologique mais aussi par son propre comportement, de son intégrité somatique et énergétique (en recherchant la proximité du corps maternel ou la chaleur du nid) et des apports extérieurs qui garantissent la transition métabolique (ingestion/digestion du colostrum et du lait). L'ensemble de ces ressources est à présent accessible sur la surface du corps maternel, et le nouveau-né doit donc être capable d'exécuter diverses actions orientées vers celle-ci et vers les régions spécialisées par lesquelles les transferts de matières sont opérés.

Le transfert du lait est réalisé au niveau de structures protubérantes de l'abdomen maternel: les **tétines** ou **mamelons**. Dans les premières heures et jours de vie postnatals, le nouveau-né doit localiser et saisir oralement une tétine afin d'ingérer le colostrum/lait.

Les savants de tous bords, biologistes, pédiatres, psychologues, se sont intéressés aux premiers comportements des nouveau-nés de mammifères en s'interrogeant sur la nature des signaux qui les dirigent, ainsi que sur la nature des processus qui les motivent et les organisent au cours du développement. Par exemple, Darwin (1872) s'est interrogé sur la façon dont « *les jeunes mammifères ont instinctivement appris à téter la mamelle* » (p. 234). Après lui, de nombreux auteurs ont tenté d'échafauder des scénarios évolutifs sur l'émergence de la lactation propre aux Mammifères et sur la progression des ajustements morphologiques, physiologiques et comportementaux nécessaires pour que les partenaires de la dyade mère-enfant interagissent de façon adaptative, c'est-à-dire immédiatement efficace pour la survie individuelle et en même temps pour assurer la perpétuation de l'espèce.

Les mammifères ont élaboré différentes stratégies d'interactions sociales au sein du système mère-enfant définies en fonction du niveau de maturité physiologique et sensori-moteur du nouveau-né : la nidicolie, la nidifugie et toutes les stratégies intermédiaires. Chez les espèces nidicoles, dont font partis les rongeurs (rat, souris, hamster), leurs systèmes visuel, auditif et

thermorégulateur ne sont pas fonctionnels à la naissance, et ce, jusqu'à la deuxième semaine de vie. Les comportements maternels (dont l'allaitement) ont lieu au sein du nid et la mère ramène tout nouveau-né qui en sort (González-Mariscal & Poindron, 2002 ; Rosenblatt & Lehrman, 1963). Chez les espèces nidifuges, comprenant les ovins, bovins, pinnipèdes, les cétacés, mais également certains rongeurs comme le cobaye, les nouveau-nés apparaissent autonomes sur les plans sensoriel et moteur (mobilité autonome, thermogénèse stable, audition et vision fonctionnelles). Pour finir, chez les espèces présentant des stratégies intermédiaires, les nouveau-nés sont dotés des capacités sensorielles plus élevées que les nouveau-nés nidicoles mais ont néanmoins une dépendance thermogénétique (suidés) ou motrice (primates). Mais, quel que soit le niveau d'autonomie physiologique et de maturité sensorielle du nouveau-né à la naissance, l'olfaction joue un rôle crucial dans la survie néonatale. En effet, l'altération de l'émission chimiosensorielle de la mère (par masquage ou lavage) ou la suppression de la chimioréception du nouveau-né (par anesthésie temporaire ou lésion périphérique ou centrale) perturbent le nouveau-né dans sa performance de localisation des tétes et de succion, menant à la perte de poids et, dans certains cas, à la mort (espèces nidicoles : souris : Hongo et al., 2000 ; rat : Singh & Hofer, 1978 ; Singh et al., 1976 ; Teicher & Blass, 1977 ; lapin : Distel & Hudson, 1985 ; Hudson & Distel, 1983 ; chat : Larson & Stein, 1984; espèce nidifuge : mouton : Vince et al., 1987 ; espèces intermédiaires : humain : Doucet et al., 2007 ; porc : Morrow-Tesh & McGlone, 1990). Par conséquent, les signaux chimiques ont un rôle critique dans le comportement néonatal.

La nature des sources et des indices olfactifs qui régulent le comportement de tétée apparaissent hautement spécifiques chez les mammifères, bien que leurs nouveau-nés aient à s'adapter à des contraintes du même ordre. La séquence comportementale qui mène à la tétée est enclenchée par un nombre restreint de sources/substances odorantes. Par exemple, chez les rongeurs, les **souriceaux** de 2 jours sont attirés par l'odeur du *liquide amniotique* et affichent une saisie préférentielle des tétes odorisées au liquide amniotique (Kodama, 1990). Chez le **raton**, les substrats extra-mammaires déposés sur les tétes par la femelle allaitante, tels que le *liquide amniotique*, la *salive maternelle* et la *salive infantile*, sont d'emblée très réactogènes (Teicher & Blass, 1976; 1977). Par ailleurs, un composé de la salive infantile, le *diméthyle disulfure*, a été caractérisé comme étant spontanément réactogène pour les rats nouveau-nés et fœtus (Pedersen & Blass, 1981; Smotherman & Robinson, 1992). Chez le **lapin**, la localisation de la tétée doit être réalisée dans un laps de temps très court car la femelle visite son nid 5 minutes par jour (Venge, 1963; Zarrow et al., 1965). Pour optimiser le succès de la

tétée dans ces conditions, des signaux olfactifs sont émis au niveau de l'abdomen de la femelle allaitante (Hudson & Distel, 1983) et dans le lait (Keil et al., 1990). Celui-ci contient de nombreux odorants, dont un composé à valeur de phéromone, le *2-méthylbut-2-énal* (2MB2), qui déclenchent les mouvements de recherche et de saisie orale de la tétine chez le lapereau (Schaal et al., 2003). Chez les ongulés, les **porcelets** expriment une préférence envers les odeurs de *fèces* maternelles par rapport à des odeurs de substrats mammaires tels que le colostrum/lait et le lavis de tétine maternelle (Morrow-Tesch & McGlone, 1990). Cependant, les odeurs de *lait* et de *liquide amniotique* sont également attractives pour les nouveau-nés (Parfet & Gonyou, 1991). Dans le cas de la **brebis**, les glandes inguinales sécrètent une *cire* qui induit une réponse d'éveil et d'attraction de la part des agneaux (Vince & Ward, 1984). L'odeur du *lait* ovin et du *liquide amniotique* sont également réactogènes pour les agneaux (Schaal et al., 1995b ; Vince & Ward, 1984). Chez l'**humain**, les *glandes aréolaires* (dites de Montgomery) produisent des sécrétions qui modulent les réponses orales appétitives et respiratoire du nouveau-né (Doucet et al., 2009). Le *colostrum* et le *lait* déclenchent le même type de réponses d'attraction et d'activation orale (Marlier & Schaal, 2005). Enfin, le nouveau-né est attiré de façon indifférenciée vers l'odeur du colostrum/lait et celle du *liquide amniotique* entre 1 et 3 jours de vie (Marlier et al., 1997). En somme, chez toutes les espèces de mammifères étudiées, les femelles et leur progéniture ont mis en place des mécanismes d'émission et de réception de signaux chimiosensoriels qui permettent le guidage du nouveau-né inexpérimenté vers la tétine. Ces études ont souligné que les capacités précoces de détection, de discrimination et de mémorisation olfactive, jouent un rôle déterminant dans l'organisation de la relation mère-enfant et dans la prise alimentaire chez le nouveau-né.

Malgré ces nombreuses avancées scientifiques, les questions demeurent nombreuses sur le développement du comportement néonatal qui mène au succès de l'ingestion du lait: **Comment un nouveau-né immature et inexpérimenté s'oriente-t-il vers une tétine maternelle, s'en saisit, et exerce des mouvements de succion, dès les premières heures de vie postnatale? Quelle est la nature des échanges sensoriels entre la mère et les jeunes qui pilotent l'activité d'ingestion des nouveau-nés? Est-ce que la communication chimique évolue au cours du développement des jeunes? Existe-t-il une ou des période(s) plus propice(s) pour l'émission des messages maternels et leur réception par le nouveau-né? Quels sont les mécanismes cognitifs sous-jacents à l'établissement des réponses adaptatives et comment se transforment-ils au cours du développement?**

Cette recherche vise à examiner la nature des échanges d'informations chimiosensorielles responsables de la mise en place des comportements d'ingestion chez le souriceau nouveau-né. Bien que la souris représente l'un des modèles biologiques les plus étudiés, les mécanismes sensoriels et neuro-comportementaux qui gouvernent cette phase déterminante de la reproduction restent peu explorés. Afin d'étudier les échanges au sein de la « dyade » mère-jeunes, nous utiliserons les méthodes de l'éthologie expérimentale (Tinbergen, 1963). Nous nous attacherons à déconstruire le contexte de tétée, en tentant d'en décomposer la complexité chimiosensorielle, pour présenter des indices en nombre restreint et contrôlé.

2) LA COMMUNICATION CHIMIQUE CHEZ LES RONGEURS

2.1) Sources odorantes

Chez les rongeurs, l'olfaction est considérée comme l'un des plus importants moyens de communication dans la plupart des contextes sociaux (Brown, 1979). Les signaux chimiques émanent de nombreuses glandes cutanées (sébacées, sudoripares apocrines) et spécialisées (salivaires, mammaires, lacrymales, etc.) (Hedrich & Bullock, 2004; Hollmann & Verley, 1965; Richert et al., 2000). Les glandes cutanées, dont le rôle premier est dédié à l'entretien de la peau et des phanères, émettent nombres de substances qui sont secondairement utilisées pour leurs valeurs odorantes (**Figure 1**). Ces sécrétions ou excréctions corporelles, telles que la salive, le lait, les larmes, les sécrétions génitales, l'urine, et les fèces, peuvent contenir des indices/signaux olfactifs impliqués dans la communication intra-spécifique (Breen & Leshner, 1977; Haga et al., 2010 ; Hurst et al., 1998 ; Roberts et al., 2010).

La qualité et la composition de ces odeurs sociales sont régulées par différents facteurs stables propres à chaque individu (type génétique et immunogénétique), à un groupe d'individus (âge, genre) ou à un stade développemental, soit par des caractéristiques variables liées à des fluctuations hormonales, métaboliques et psychobiologiques (statut reproductif, alimentation, stress, dominance, pathologie). L'odeur résultante de l'individu est à la fois complexe, singulière, et dynamique tout au long de la vie. Les composés actifs peuvent être volatils ou non, permettant une détection à plus ou moins longue distance. En effet, les fractions non-volatiles caractérisées par des protéines, des lipides, ou des hydrocarbures peuvent agir soit comme des transporteurs ou des précurseurs de ligands volatils, soit comme des fixateurs qui prolongent la durée de l'émission des composés volatils associés. En somme, toutes ces

sources odorantes véhiculent des informations chimiosensorielles, qui une fois détectées, modifient la physiologie et le comportement du (ou des) individu(s) receveur(s) (Arakawa et al., 2008 ; Bowers & Alexander, 1967; Brown & MacDonald, 1985; Wyatt, 2003).

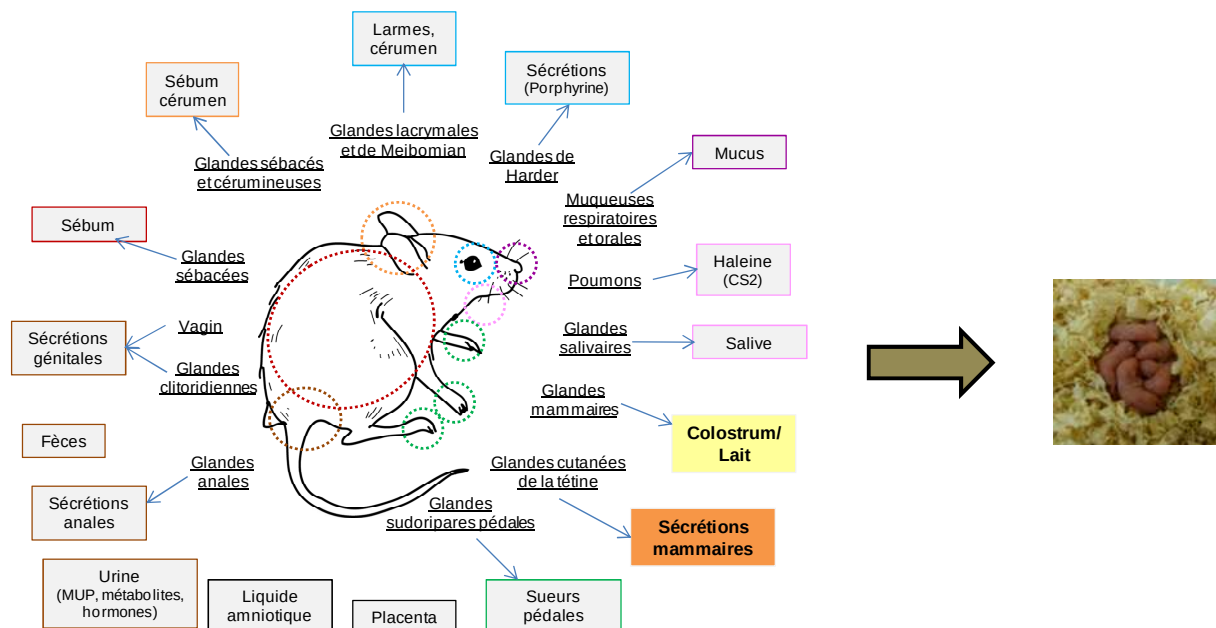


Figure 1. Sécrétions et excréments produits par la mère potentiellement impliquées dans la communication mère-jeunes chez la souris

2.2) Effets physiologiques et comportementaux des stimulations odorantes

Chez la souris, les odeurs urinaires des mâles jouent un rôle majeur dans la communication en contextes agonistique et sexuel. Plus particulièrement, les protéines de la famille des MUP (Major Urinary Proteins), véhiculées dans l'urine de mâles, vont aussi bien attirer les femelles que les mâles adultes, favorisant ainsi l'investigation des marques urinaires (Hurst et al., 1998). Les mâles *Mus musculus* signalent leur localisation, leur territoire et leur statut de dominance à travers le dépôt continu de marquages olfactifs (Hurst & Beynon, 2004). Des odorants urinaires régulent la physiologie reproductrice de la femelle, ainsi que ses comportements. Les dépôts urinaires des mâles accélèrent l'apparition de la puberté, induisent l'œstrus, et synchronisent les cycles œstriens des femelles (Vandenbergh, 1969; Whitten, 1956, 1957, 1958). De plus, les sécrétions salivaires et préputiales du mâle induisent l'œstrus chez la femelle (Marchlewska-Koj et al., 1990). Cependant, l'odeur des mâles peut aussi avoir un impact négatif sur la gestation : l'odeur d'un mâle non familier empêche l'embryon de s'implanter (Brennan & Peele, 2003 ; Bruce, 1959).

Au niveau comportemental, l'urine de mâle contient une protéine, la *Darcine*, qui déclenche l'attraction inconditionnelle des femelles (Roberts et al., 2010). Une autre substance à valeur

de phéromone, l'*EPS1* (Exocrine gland-secreting peptide 1), sécrétée par les glandes lacrymales de souris mâles, a pour effet d'augmenter la réceptivité sexuelle et le comportement de lordose de la femelle, maximisant ainsi le succès copulateur (Haga et al., 2010).

En résumé, la souris produit une grande variété de substances biologiques émises par différentes sources corporelles et qui régulent la plupart des réponses comportementales chez les adultes. Mais, de façon surprenante, nous n'avons, à ce jour, que peu d'informations sur la nature des échanges chimiosensoriels qui gouvernent la relation mère-jeunes chez cette espèce.

3) ORGANISATION DE LA RELATION MERE-JEUNES CHEZ LA SOURIS

Chez les mammifères, des mécanismes physiologiques, cognitifs, comportementaux et sociaux ont été sélectionnés pour favoriser l'établissement de relations coordonnées entre les mères et leur progéniture. La mère fournit une protection physique et immunitaire, des soins, des ressources nutritives et des informations (Gonzalez-Mariscal & Poindron, 2002; Schaal et al., 2009). Malgré les comportements de soin déployés par la femelle allaitante, la survie et le développement du nouveau-né vont dépendre de sa capacité à exploiter efficacement les indices sensoriels émis par cette dernière.

3.1) Physiologie de la reproduction et comportements maternels chez la souris

Gestation. Dans des conditions favorables, les femelles souris domestiques accèdent à la maturité sexuelle à environ 6-8 semaines de vie. Leur cycle ovarien est relativement court avec un œstrus variant entre 4 et 6 jours (Berry, 1970 ; Bronson et al., 1966), durée qui peut fluctuer en fonction de différents facteurs comme la saison, le régime alimentaire et les conditions environnementales (Baumans, 2004 ; Murray et al., 2010). La gestation dure entre 18 et 21 jours (Baumans, 2004 ; Labov et al., 1985; Murray et al., 2010 : 20-21 jours chez la souche BALB/c), au cours de laquelle le poids de la femelle augmente de 25 à 51% (37% pour la souche BALB/c). Quelle que soit la souche de laboratoire testée, le nombre de souriceau moyen par portée varie entre 3 et 10 petits ; avec 6 souriceaux en moyenne par portée chez la souche BALB/c (Festing, 1968 ; Murray et al., 2010). En somme, ces caractéristiques permettent la prolifération de cette espèce.

Le comportement maternel est défini comme l'ensemble des comportements de la mère qui vont augmenter la survie de la progéniture (Krasnegor & Bridges, 1990). Dans les derniers jours de gestation, la femelle construit un nid (Ewer, 1968; Berry, 1970; Lisk, 1971). Cette structure tend à maintenir constante la température corporelle des souriceaux, dont les capacités thermorégulatrices ne sont pas abouties (Lagerspetz, 1966).

Parturition. Chez la souris, la mise-bas a lieu la plupart du temps au cours de la phase nocturne et dure entre 1h30 et 4 h (Wilson & Edwards, 1963). La délivrance est suivie par un œstrus-postpartum avec une ovulation de 12-18 h (Berry, 1970 ; Merton, 1938). L'intervalle moyen entre deux portées varie en moyenne de 26 à 33 jours selon la lignée (BALB/c : 33 jours ; Festing, 1968). La femelle assiste l'émergence de chacun des nouveau-nés du conduit génital, détache le placenta et le cordon ombilical, et lèche le nouveau-né en le débarrassant des membranes et fluides fœtaux. Cette séquence comportementale est terminée avant l'expulsion du nouveau-né suivant (Kuroda et al., 2011 ; Weber & Olsson, 2008). Généralement, au cours de cette phase, les nouveau-nés restent éparpillés autour de la femelle et tendent à se refroidir du fait de l'évaporation des fluides fœtaux.

Le nid peut être occupé par plusieurs femelles qui mettent bas généralement de façon synchrone, ce qui favorise ainsi l'apparition de soins et d'allaitements communautaires (Hayes, 2000). Ce phénomène, documenté chez plusieurs espèces de mammifères (Packer et al., 1992), permet d'améliorer la thermorégulation, la défense du nid et la survie néonatale (Hayes, 2000 ; König, 1994; Manning et al., 1995). Ces soins et allaitement collectifs ont été rapportés en laboratoire (König, 1994 ; Sayler & Salmon, 1971), en milieu semi-naturel (Manning et al., 1995), aussi bien qu'en milieu naturel (Wilkinson & Baker, 1988).

De la parturition au sevrage. Après la mise-bas, la femelle rassemble sa portée dans le nid et se positionne au-dessus d'eux, rendant la région mammaire accessible pour une première tétée (souris : Brown et al., 1996 ; rat : Ronca et al., 1993 ; Rosenblatt & Lehrman, 1963). Tout au long de cette période, la femelle assiste sa progéniture en restant la majorité du temps en contact physique avec eux, jusqu'à 9 jours post-partum, et en adoptant fréquemment des postures d'allaitement. L'allaitement représente 90% du budget-temps maternel (König & Markl, 1987 ; Ewer, 1968; Williams & Scott, 1953). Le comportement d'allaitement est initié exclusivement par la mère jusqu'à l'âge de 13 jours, où les premières tentatives de tétées autonomes ont été observées de la part des souriceaux (Weber & Olsson, 2008). Par ailleurs, les léchages uro-génitaux de la souris et de la ratte au cours des deux premières semaines de

vie postnatale sont déterminants pour induire la miction et la défécation des souriceaux (Ewer, 1968). Pour maintenir le niveau d'attention maternelle au cours des 2-3 premières semaines postpartum, et surtout entre les 2^{ème} et 15^{ème} jours, les souriceaux émettent plusieurs catégories de vocalisations ultrasoniques. La femelle est sensible à ces vocalisations et adapte ses réponses comportementales en fonction de la nature des vocalisations: attraction vers le jeune et ramené au nid, inhibition du comportement provoquant la douleur, induction des comportements maternels, et plus spécifiquement, des léchages (Ehret & Bernecker, 1986 ; Weber & Olsson, 2008).

La durée moyenne de la lactation est d'environ 3 semaines, et les souriceaux sont généralement sevrés autour du 25^{ème} jour de vie (Williams & Scott, 1953 ; Weber & Olsson, 2008). La production de lait n'est pas constante au cours de la lactation, aussi bien au niveau qualitatif que quantitatif. Une diminution du volume de lait se produit à partir du 11-14^{ème} jour postpartum, et ce, jusqu'au sevrage (Knight & Peaker, 1982 ; Hanrahan & Eisen, 1970 cité dans Ragueneau, 1987).

En somme, la dyade mère-jeunes chez la souris est caractérisée par des comportements maternels complexes et quasi-permanents (notamment dans la lignée BALB/c ; Weber & Olsson, 2008), fournissant une assistance aux nouveau-nés inexpérimentés.

3.2) Transitions développementales du souriceau

3.2.1) La notion de niche ontogénétique

Le concept de niche ontogénétique prend en compte le fait que les caractéristiques de l'écologie individuelle changent au cours du développement de l'individu (Alberts, 1987 ; Alberts & Cramer, 1988 ; Galef, 1981). Cette conceptualisation présente le développement postnatal comme une succession d'adaptations physiologiques et comportementales à des transitions prédictibles de l'environnement. Alberts (2008) a appliqué cette perspective de l'adaptation ontogénétique à l'activité d'ingestion. Il a défini le concept de niche d'ingestion en fonction de la nature des aliments que l'individu consomme et de la façon dont il les ingère.

La **Figure 2** illustre les quatre niches ontogénétiques du souriceau, et de la plupart des rongeurs, au cours de leur développement (adapté de Alberts, 2008). La première niche est la cavité utérine maternelle où chaque fœtus est logé dans son propre sac amniotique. L'oxygène et les éléments nutritifs sont passivement transmis au fœtus via le placenta.

La deuxième niche réfère au milieu aérien postnatal et plus particulièrement au corps maternel. A la naissance, les souriceaux sont pourvus de systèmes sensori-moteurs et de capacités thermorégulatrices pleinement adaptés à la prise alimentaire dans un environnement thermorégulé par la mère et la fratrie au sein du nid. L'oxygène atmosphérique est inhalé par les poumons et les apports nutritifs sont activement recherchés et ingérés à partir du corps de la mère, puis assimilés par des processus gastro-intestinaux qui se mettent en place progressivement.

Après la deuxième semaine de vie postnatale, la mère s'absente de plus en plus fréquemment et longuement du nid (Weber & Olsson, 2008), ce qui diminue l'impact du corps maternel en tant qu'élément principal dans la niche de développement. La troisième niche désigne l'assemblage de la portée au sein du nid. Incapables de réguler leur température corporelle jusqu'à l'âge de 12 à 28 jours (Clough, 1982; Berry & Bronson, 1992), les souriceaux se rassemblent, en l'absence de la mère, dans un mouvement dynamique qui alterne les positions périphériques et les positions centrales les plus réchauffantes (Smith, 1981).

Autour de la troisième semaine de vie, la cohorte sociale représente la quatrième et dernière niche ontogénétique. A ce stade, les jeunes sont sensibles aux indices émis par les autres congénères en âge de s'accoupler et ils modèlent leurs habitudes alimentaires, d'exploration, de jeu, en vivant au sein d'un groupe social. Par conséquent, chaque souriceau doit, tout au long du développement précoce, ajuster ses propres comportements et sa physiologie à ceux de la mère et du nid, au reste de la fratrie, puis, aux autres congénères adultes du groupe (Alberts, 2008; Alberts & Cramer, 1988).

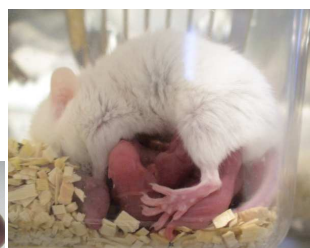
Niche 1 :

Cavité utérine
maternelle¹



Niche 2:

Corps maternel



Niche 3 :

Assemblage/enfouissement
de la portée dans le nid



Niche 4 :

Cohorte sociale



Figure 2. Les quatre niches ontogénétiques de la souris de la conception au sevrage (adapté de Alberts, 2008).

¹ Photo d'un fœtus souris à 18 jours de gestation : <http://www.geekosystem.com/mouse-embryo-grows/>

3.2.2) Les niches ingestives précoces

La séquence des niches ontogénétiques contraint les nouveau-nés à des ajustements constants à différents niveaux fonctionnels (anatomiques, physiologiques, sensoriels, comportementaux). Ils doivent alors s'adapter aux quatre niches d'ingestion correspondantes: 1) le transfert mère-fœtus des nutriments à travers le placenta (Niche 1), 2) le comportement actif de tétée pour ingérer exclusivement du lait (Niche 2), 3) la transition de l'alimentation lactée à l'alimentation solide (Niche 3), et 4) l'ingestion exclusive d'aliment solide (Niche 4) (**Figure 3**).

Ingestion passive in utero. Le liquide amniotique fournit protection physique et stabilité osmotique. Il véhicule ainsi des facteurs nutritionnels, des facteurs de croissance et de protection tout au long du développement du fœtus (Cheung & Brace, 2005 ; Renfree et al., 1975). En fin de gestation, chez les rongeurs, sa texture s'épaissit et facilite les mouvements du fœtus. D'un point de vue comportemental, le fœtus paraît relativement passif puisqu'il est « perfusé » par voie placentaire des apports respiratoires et nutritionnels. Le fluide amniotique est aussi porteur d'éléments chimiosensoriels qui influencent la structuration de l'olfaction. Coppola et Millar (1997) ont ainsi mis en évidence que le fœtus de souris présente, d'une part, une activité motrice plus variée et plus fréquente lorsqu'il est exposé à des odorants (acétate d'isoamyle et acide isovalérique) par rapport à une solution saline, et d'autre part, une capacité de discrimination entre ces deux odorants. L'exposition à de telles stimulations prénatales oriente le développement nerveux et comportemental du fœtus (Patris et al., 2009; Todrank et al., 2011).

Initiation de l'ingestion active d'aliments liquides. Grâce à ses capacités sensorimotrices, le nouveau-né parvient dans les 3-5 premières heures de vie à s'orienter vers le corps de la mère et à échantillonner la surface abdominale par des mouvements céphaliques de recherche. Le nouveau-né est ainsi capable de localiser et saisir l'une des 10 tétines disponibles. Une fois saisie, il exerce sur la tétine la succion qui lui permet d'extraire le colostrum/lait, pour enfin le digérer. A la naissance, les nouveau-nés pèsent environ 1 g et sont dépourvus de pelage, leurs systèmes visuel et auditif ne sont pas fonctionnels. La somesthésie faciale (vibrisses) et périorale, ainsi que la chimioréception nasale et orale, fonctionnelles bien qu'en pleine maturation, sont donc mis en jeu dans la quête de l'aliment lacté (Berry & Bronson, 1992 ; Ehret, 1976; Ewer, 1968; König & Markl, 1987 ; Weber & Olsson, 2008). Durant cette

période, le tube digestif doit acquérir à la fois la capacité de taiter les aliments et d'absorber les nutriments, de se défendre contre les bactéries pathogènes, et d'éliminer les toxines.

Transition de l'ingestion active du lait à l'aliment solide. Après la deuxième semaine, la diminution de la disponibilité de la femelle, mais aussi de la quantité du lait maternel (Knight & Peaker, 1982 ; Hanrahan & Eisen, 1970) pousse les nouveau-nés vers une nouvelle niche ingestive. Pour subvenir à leurs besoins énergétiques, ils doivent adopter une stratégie ingestive associant le lait maternel et les aliments non-lactés. De petites quantités d'aliment solide sont alors ingérées à partir de 10-17 jours de vie (Williams & Scott, 1953; Knight & Peaker, 1982 ; König & Markl, 1987). Cette période coïncide avec l'apparition des capacités visuelles des souriceaux à 14-15 jours (Fuchs, 1981; Smith, 1981; Williams & Scott, 1953) et s'accompagne d'explorations actives de l'environnement en dehors du nid. A cours de la période de pré-sevrage, l'épithélium du tube digestif perd progressivement son aptitude à absorber le lait et acquiert des propriétés physiologiques compatibles avec l'ingestion d'aliments non-lactés. Les modifications physiologiques sont alors nombreuses, comme, par exemple, l'activité de la lactase élevée jusqu'aux 20^{ème} jour de lactation, puis qui diminue de façon abrupte (rat : Alvarez & Sas, 1961; Rubino et al., 1964). Les souriceaux sont toutefois sélectifs quant à la nature de ces nouveaux aliments solides et tendent à consommer préférentiellement ceux déjà ingérés par la mère ou par des congénères familiers (Choleris et al., 1997; Crawley, 2000 ; Valsecchi & Galef, 1989 ; Valsecchi et al., 1989).

Ingestion exclusive d'aliments non lactés. La dernière niche ingestive sollicite la consommation exclusive d'aliments solides, demandant la mise en place de mécanismes physiologiques et comportementaux (mastication) permettant d'en assumer l'ingestion et la digestion. Le sevrage est établi lorsque les jeunes sont au contact de la mère sans téter. Williams et Scott (1953) ont déterminé que le sevrage apparaît à 23 jours de vie dans des conditions de laboratoire. Au moment du sevrage, les jeunes pèsent en moyenne 9-10 g, poids variant en fonction de la taille de la portée (König & Markl, 1987; Mendl & Paul, 1991 ; Weber & Olsson, 2008). Le moment du sevrage dépend aussi du poids des petits, les souriceaux de faibles poids pouvant être sevrés plus tardivement, jusqu'à 35 jours (Drickamer et al., 2000 ; König & Markl, 1987; Mendl & Paul, 1991).

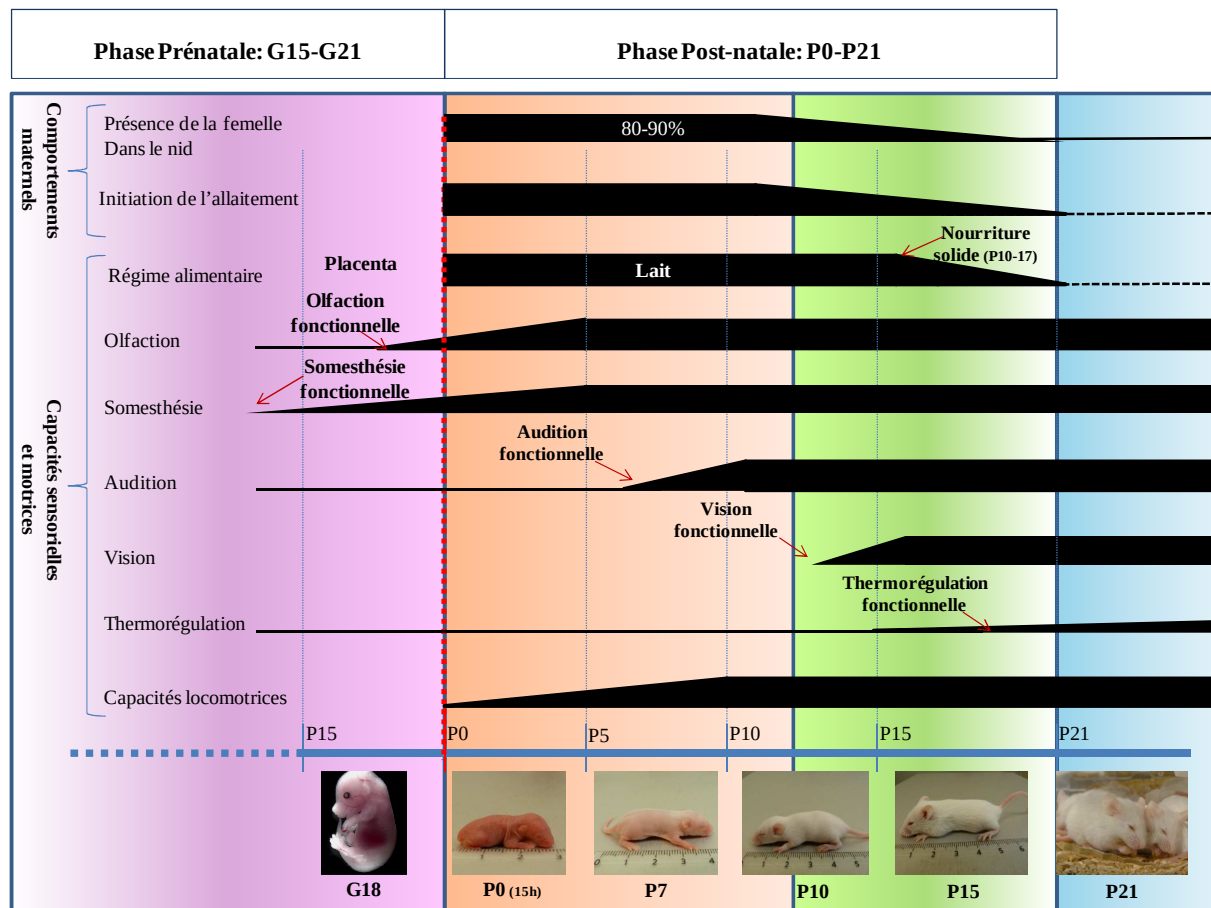


Figure 3. Schéma récapitulatif des comportements maternels, des capacités sensori-motrices du souriceau et des niches ingestives rencontrées par nouveau-né au cours de son développement précoce. Les quatre niches ingestives sont représentées par un code couleur: 1) le transfert mère-fœtus des nutriments à travers le placenta (fond rose), 2) le comportement actif de tétée de la mamelle pour ingérer exclusivement du lait (fond orange), 3) la transition de l'alimentation lactée à l'alimentation solide (fond vert), et 4) l'ingestion exclusive d'aliment solide (fond bleu).

Ces différentes transitions sont critiques parce que les nouveau-nés de mammifères sont soumis à des pressions de sélections extrêmement sévères et des réponses inadaptées de la mère ou des petits peuvent conduire à la mort d'un individu, voire de la portée. Les deux périodes du développement précoce comptabilisant le plus fort taux de mortalité infantile se situent ainsi juste après la naissance et au moment du sevrage, car elles exigent les ajustements physiologiques, comportementaux, cognitifs et sociaux les plus conséquents (Schaal, 2010).

Notre projet de recherche s'est concentré sur l'étude du développement des réponses d'ingestion des souriceaux lors des premiers jours de vie postnatale. Les rongeurs étant dotés de systèmes somesthésique et chimioréceptif fonctionnels à la naissance (Coppola & Millar, 1997), nous avons comme objectif d'évaluer le rôle des informations olfactives émises par la

femelle allaitante dans la régulation des interactions mère-nouveau-né et, plus particulièrement, dans la prise alimentaire (lactée) du nouveau-né.

4) COMMUNICATION CHIMIQUE IMPLIQUEE DANS LA RELATION MERE-JEUNES CHEZ LES RONGEURS

4.1) Des odeurs mammaires qui induisent la saisie de la tétine

4.1.1) La tétine maternelle : une interface singulière

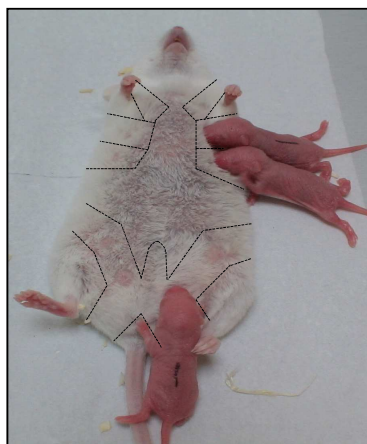
Oftedal (2002) a émis l'hypothèse que les glandes mammaires ont évolué à partir de glandes apocrines associées à des follicules pileux, faisant émerger des champs mammaires chez les protothériens et de vraies mamelles chez les euthériens. Selon les espèces, les glandes mammaires sont situées sur les régions thoraciques, abdominales ou inguinales, et distribuées par paires symétriques au nombre de 1 (primates) à plus de 11 (Schaal, 2010). La souris compte 10 glandes mammaires (**Figure 4**).

Les structures mammaires présentent des caractéristiques propres d'un point de vue tactile, thermique, hygrométrique et chimiosensoriel (Schaal, 2010). Les tétines sont ainsi différenciables du reste de l'abdomen maternel par leurs qualités : 1) physique : elles constituent des appendices érectiles de texture plissée et glabre; 2) thermique : les structures mammaires sont des régions hautement vascularisées responsables d'une température de surface supérieure à celle du reste du corps (observations personnelles mesurées à l'aide de la caméra thermique: $36.80 \pm 0.15^{\circ}\text{C}$ à la surface d'une tétine versus $35.80 \pm 0.36^{\circ}\text{C}$ à la surface du pelage de l'abdomen chez des femelles allaitantes souris); 3) hygrométrique : l'humidité est plus forte par rapport au reste de l'abdomen grâce aux tétées successives des souriceaux et aux propres léchages de la mère, qui ont lieu plus fréquemment sur cette zone du corps (souris: Harvey & Mann, 1987; rats: Roth & Rosenblatt, 1967; Serafim & Felicio, 2002); et 4) chimique : par la présence de composés sécrétés spécifiquement par les glandes mammaires ou déposées spécifiquement sur la région mammaire. Par conséquent, les régions mammaires constituent des véritables « points chauds » que le nouveau-né peut utiliser pour s'orienter sur l'abdomen de la femelle.

4.1.2) Implication de l'olfaction dans la saisie de la tétine

Chez les rongeurs, les nouveau-nés sont principalement assistés par des indices chimiosensoriels émis par les structures mammaires (souris : Hongo et al., 2000 ; rat : Teicher & Blass, 1977 ; pour revue : Schaal, 2010). En effet, la localisation et la saisie de la tétine maternelle peuvent être perturbées par des procédures de lavages (souris : Hongo et al., 2000 ; rat : Hofer et al., 1976 ; Teicher & Blass, 1976 ; 1977). Ainsi, des souriceaux qui tètent efficacement une tétine dès les premières heures postnatales, voient leur performance décroître face à une tétine lavée à l'eau distillée (Hongo et al., 2000). Chez le raton, le comportement de saisie d'une tétine lavée est restauré après application du lavis d'une tétine de femelle allaitante sur une tétine lavée (Teicher & Blass, 1976 ; 1977). En somme, les indices chimiosensoriels émis par la région mammaire sont essentiels pour orienter les nouveau-nés rongeurs vers la tétine. Ces émissions chimiques sont peu volatiles et peu résistantes au lavage (même à l'eau distillée).

A)



B)

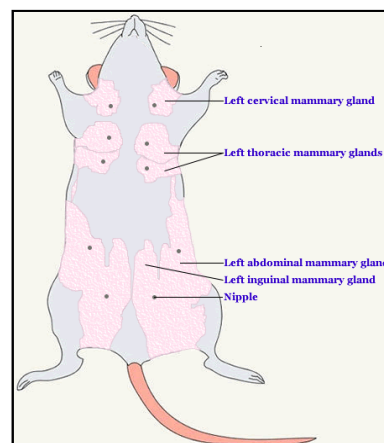


Figure 4. Vue ventrale d'une souris allaitante où l'étendue de la zone des glandes mammaires a été représentée (Photo de droite : Conti et al., 2004).

4.2) Mécanismes sensoriels et cognitifs néonataux impliqués dans l'initiation de la tétée

4.2.1) Les odeurs prénatales impliquées dans l'induction de la première tétée

Chez un grand nombre d'espèces de mammifères, le **fluide amniotique** déclenche des réponses avides chez les nouveau-nés à la naissance et dans les premiers jours de vie postnatale (souris : Kodama, 1990; rat : Arias & Chotro, 2007; Blass, 1990; Blass & Teicher,

1980; Korthank & Robinson, 1998; Mendez-Gallardo & Robinson, 2011; Teicher & Blass, 1977 ; lapin : Coureaud et al., 2002 ; mouton : Vince & Ward, 1984 ; humain : Marlier et al., 1998). Par exemple, les souriceaux de 2 jours saisissent préférentiellement une tétine de femelle allaitante recouverte de liquide amniotique par rapport à une tétine badigeonnée d'une solution saline, et ils évitent une tétine odorisée à la vanille (Kodama, 1990). Chez le rat, le substrat olfactif responsable de la première saisie de tétine est le liquide amniotique (Koffmann et al., 1998 ; Teicher & Blass, 1977) ; ce fluide prénatal se retrouve abondamment distribué sur l'abdomen et plus particulièrement sur les régions mammaires suite aux nombreux léchages de la femelle pendant et juste après la parturition.

Le liquide amniotique se retrouve donc dans les milieux périnataux et cette relative continuité chimique guiderait le nouveau-né vers l'abdomen et les tétines maternelles. Ce processus de continuité chimiosensorielle transnatale se fonde sur les capacités d'apprentissage fœtal des caractéristiques chimiosensorielles du liquide amniotique et sur leur utilisation dans l'orientation néonatale dans le milieu postnatal (Alberts & Ronca, 2012; Coureaud et al., 2002; Pedersen & Blass, 1982; Schaal, 2005; Schaal & Orgeur, 1992). Par exemple, Pedersen et Blass (1982) ont étudié le rôle de l'apprentissage olfactif dans l'induction du premier comportement de saisie de tétine chez le raton. Cette étude a consisté à modifier la composition chimique du liquide amniotique en injectant du citral dans l'environnement prénatal, et/ou à exposer les nouveau-nés à l'odeur de citral associé à des caresses pendant 1 heure avant toute expérience de tétée. Seuls les ratons exposés à l'odeur de citral avant et après la naissance ont tété une tétine odorisée au citral, et n'ont pas répondu à une tétine de femelle allaitante olfactivement intacte. À l'inverse, les ratons exposés à l'odeur de citral, soit avant, soit après la naissance, n'ont pas saisi la tétine odorisée au citral, tandis qu'ils ont saisi une tétine intacte de femelle allaitante. Ces résultats indiquent que la continuité chimiosensorielle détermine le déclenchement de la première saisie de tétine. La reconnaissance postnatale indique que les caractéristiques chimiosensorielles du liquide amniotique sont apprises et mémorisées au cours de la vie intra-utérine via des processus de familiarisation et/ou de conditionnements liés à des événements périnataux renforçants, comme par exemple, les contractions utérines, la chaleur et les léchages maternels, ou encore la prise de lait (Alberts & Ronca, 2012; Miller & Spear, 2009; Ronca & Alberts, 1994, 1995).

4.2.2) Les odeurs postnatales impliquées dans l'induction de la première tétée

Le liquide amniotique n'est pas le seul déclencheur de la saisie de la tétine chez les nouveau-nés inexpérimentés. Chez le rat, la **salive maternelle** appliquée sur une tétine préalablement lavée permet d'en réinstaurer la saisie, contrairement à la salive de femelle vierge, à l'urine maternelle, à une solution isotonique saline ou à des odorants arbitraires (Teicher & Blass, 1977). Par ailleurs, chez plusieurs espèces de mammifères, les composés volatils véhiculés par le **lait homospécifique** déclenchent des réponses comportementales appétitives chez les nouveau-nés (humain: Marlier & Schaal, 2005; Raimbault et al., 2007; lapin : Coureaud et al., 2001; Keil et al., 1990; porc : Parfet & Goyou, 1991 ; mouton : Schaal, 2005 ; Vince & Ward, 1984).

4.2.3) Fluctuation de la signification des odeurs inductrices de la tétée en fonction de l'expérience néonatale

Les capacités d'apprentissage sont sollicitées dans la formation des réponses adaptatives lors des transitions d'une niche à l'autre. Ces apprentissages néonataux sont impliqués dans la détection, la mémorisation et la reconnaissance des caractéristiques dans l'environnement physique (nid) et social (mère, père, fratrie). Différents paradigmes de conditionnement ont mis en lumière la capacité de nouveau-nés à associer une odeur neutre à un renforcement nutritif, tactile, thermique ou olfactif. Une stimulation tactile qui mime les léchages parentaux ou les contractions utérines va induire une préférence envers toute odeur associée (souris : Bouslama et al., 2005 ; raton : Sullivan & Hall, 1988 ; Sullivan & Leon, 1987; Sullivan et al., 1989; 1991a; Price et al., 1998; Wilson & Sullivan, 1994 ; nouveau-né humain : Sullivan et al., 1991b; Varendi et al., 2002). Le rôle de la stimulation nutritive dans les apprentissages précoces a été largement étudié chez les mammifères. Les souriceaux de 3, 6 et 10 jours exposés à un odorant pendant 1 heure de tétée manifestent une préférence pour cet odorant et l'intensité de la préférence est proportionnelle à la durée de l'association (Armstrong et al., 2006). La succion non-nutritive constitue également une situation renforçatrice des apprentissages olfactifs. Ainsi, des rats de 11 et 14 jours, exposés à l'odeur d'orange au cours d'une tétée nutritive ou non-nutritive, expriment par la suite, une attraction conditionnée pour cette odeur. Néanmoins, cette attraction est plus forte si la tétée a été renforcée par l'ingestion de lait (Brake, 1981). L'apprentissage postnatal a été démontré chez des rats de 1 jour de vie qui apprennent à discriminer entre deux pédales odorisées, et à actionner celle associée à la délivrance de lait (Johanson & Hall, 1979). D'un point de vue physiologique, la

prise alimentaire active le système opioïdérique endogène. Au niveau viscéral, le contact du colostrum/lait avec la muqueuse gastro-intestinale déclenche la libération d'hormones et de neuropeptides impliqués dans la physiologie digestive, mais également dans certains aspects comportementaux; c'est le cas notamment de la cholécystokinine (CCK) qui induit l'apaisement et facilite les apprentissages précoces aussi bien chez le raton (Blass, 1996) que chez l'agneau (Nowak et al., 1997). Toutes ces études montrent que le conditionnement olfactif peut provoquer des réponses appétitives chez les nouveau-nés et que ces mécanismes d'apprentissage d'odorants sont fonctionnels avant la naissance, et deviennent de plus en plus efficaces avec l'âge (Miller & Spear, 2010).

5) OBJECTIFS DE RECHERCHE

Ce travail de thèse a comme objectif principal d'étudier les processus sémiologiques impliqués dans les interactions mère-jeunes chez la souris de laboratoire (*Mus musculus domesticus*). Ce modèle présente de nombreux avantages.

5.1) Choix du modèle biologique

D'une part, la souris est une espèce nidicole dont les nouveau-nés, sont exclusivement guidés par les systèmes somesthésiques et chimiorécepteurs, les systèmes visuel et auditif n'étant pas fonctionnels. Le système olfactif est fonctionnel dès le 18^{ème} jour de vie gestationnelle (Coppola & Millar, 1997). Il reste dominant dans la régulation du comportement tout au long du développement du souriceau, même lorsque les systèmes auditifs et visuels deviennent fonctionnels (9 jours et 14-15 jours, respectivement). Cette particularité développementale offre l'opportunité d'étudier le développement des comportements contrôlés par l'olfaction.

D'autre part, beaucoup d'aspects de la communication mère-jeune impliqués dans l'induction du comportement de tétée chez la souris, restent à être étudiés. Plus particulièrement, la nature des odorants régissant les comportements d'attraction du souriceau n'est pas connue. Seul le rat, l'espèce modèle dans l'analyse du développement comportemental, a fourni un éclairage sur l'impact de certains substrats olfactifs dans l'initiation de la tétée (Blass, 1990 ; Blass & Teicher, 1980 ; Teicher & Blass, 1976; 1977 ; Pedersen & Blass, 1981; Smotherman & Robinson, 1992). Cependant, chez le rat, les sécrétions/excrétions présentes sur la tétine n'ont pas toutes été systématiquement testées et seuls certains âges du développement ont été abordés, ne fournissant que des conclusions partielles sur les mécanismes sensoriels et

cognitifs mis en jeu. Le modèle murin nous permettra de vérifier si des mécanismes comparables de guidage olfactif interviennent dans la prise de lait néonatale, et d'identifier la nature des indices olfactifs décisifs.

Ensuite, le choix d'utiliser une souche de laboratoire présente plusieurs intérêts. Les souches de souris consanguines (BALB/c, C57BL/6, et DBA/2, etc...) ont été créées entre autres pour étudier les phénomènes développementaux, les transplantations de tissus, les désordres métaboliques et comportementaux, les malformations congénitales et les réponses immunitaires (Ragueneau, 1987). Ces lignées consanguines, créées à l'origine à partir de l'espèce *Mus musculus domesticus*, résultent de croisements frères-sœurs durant plus de 20 générations, qui permettent d'obtenir 99% du génome à l'état homozygote. Grâce à nos connaissances sur la génétique moléculaire de la souris (identification totale du génome, gènes surexprimés, gènes cibles), des travaux portant sur de nombreux génotypes obtenus à partir d'animaux sélectionnés artificiellement, knockout ou transgéniques (van Meer & Raber, 2005) ont permis d'identifier les gènes impliqués dans la régulation du comportement maternel et infantile (Branchi & Ricceri, 2002 ; Bridges, 1998; Hongo et al., 2000 ; Schaller et al., 2010; Weber & Olsson, 2008). L'utilisation de lignées consanguines et de génotypes modifiés présentant des difficultés de survie, nous offrent l'opportunité de mieux appréhender l'origine génétique et biologique des troubles développementaux chez la souris.

Pour finir, le choix de la lignée BALB/c s'appuie sur les nombreuses connaissances révélées par des travaux ultérieurs relatifs au développement sensoriel et moteur du souriceau (Carlier et al., 1983 ; Ragueneau, 1987 ; Roubertoux et al., 1985) et aux comportements maternels aboutis (Weber & Olsson, 2008). Chez cette lignée BALB/c, les femelles mettent bas très fréquemment (33 jours : Festing, 1968) et le taux de mortalité infantile est très faible (2% : Murray et al., 2010), ce qui facilite le développement de l'élevage et l'expérimentation sur cette lignée.

5.2) Objectifs de la recherche

Malgré son statut d'espèce modèle majeure dans les domaines des neurosciences, de la biologie du développement et de la génétique, la souris reste négligée en ce qui concerne les bases sensorielles de la communication dans le contexte du lien mère-jeunes. A ce jour, la relation mère-jeune chez la souris a été étudiée sous différents aspects : le développement des comportements maternels (König & Markl, 1987 ; Krackow & Hoeck, 1989 ; Shoji & Kato, 2006 ; 2009), l'induction des soins maternels par des vocalisations néonatales (Branchi et al.,

1998 ; Ehret & Bernecker, 1986; Noirot, 1972), le développement sensori-moteur des souriceaux en fonction de facteurs génétiques et environnementaux (Le Roy et al., 1998), le développement neurocomportemental des souriceaux (Braastad, 1998 ; Branchi et al., 2001 ; Scattoni et al., 2009), et la communication olfactive impliquée dans la reconnaissance individuelle (discrimination entre apparentés, entre espèces) par les souriceaux (Todrank et al., 2005).

L'environnement physique et social dans lequel évolue le souriceau au cours des trois premières semaines de vie en milieu naturel se résume au nid, à la fratrie, à la mère, et dans le cas d'allaitement collectif, à d'autres femelles allaitantes souvent apparentées (König, 1994 ; Manning et al., 1995 ; Sayler & Salmon, 1971; Wilkinson & Baker, 1988). La capacité des nouveau-nés à discriminer entre des femelles étant à des stades différents de lactation, ou entre des laits d'âges lactationnels différents, optimiserait la localisation et l'ingestion d'éléments nutritifs et immunitaires adaptés aux besoins développementaux. Par conséquent, nous nous interrogerons sur les capacités des souriceaux à détecter et utiliser des informations olfactives relatives : 1) au statut physiologique de la femelle et aux substrats odorants présents sur la tétine (Partie II), et 2) à la possibilité d'une qualité olfactive spécifique du lait en fonction de l'âge lactationnel de la femelle (Partie III).

Dans la Partie II, nous tenterons d'identifier la nature des indices olfactifs maternels impliqués dans le comportement de tétée du souriceau, et ce, à différents stades précoces du développement. Nous caractériserons d'abord les substrats biologiques présumés être présents sur la tétine maternelle et qui guident l'orientation de souriceaux de 5-6 jours. Ensuite, nous tenterons d'identifier les substrats olfactifs qui induisent spécifiquement la saisie orale de la tétine au cours des premières heures postnatales. En particulier, les capacités d'apprentissage devraient jouer un rôle majeur dans l'émergence de la valeur informative des odorants. Nous aborderons ainsi les capacités associatives impliquées dans le comportement de tétée chez le souriceau.

Dans la Partie III, l'objectif général sera d'examiner si l'attractivité du lait de souris est homogène au cours de la période de lactation. Afin d'évaluer les réponses comportementales néonatales envers d'éventuelles fluctuations de l'odeur du lait, les souriceaux de différents âges seront simultanément exposés à des laits murins prélevés à différents stades de lactation chez des souris de la même souche ou de souches différentes. Dans la section II.1, nous étudierons les préférences olfactives des souriceaux BALB/c de 2, 6 et 15 jours face aux

odeurs de laits d'âges lactationnels différents. Dans la section II.2, nous examinerons ensuite les préférences olfactives des souriceaux BALB/c à la naissance exposés à des laits d'âges lactationnels différents. Enfin, dans la section II.3, une série de tests évaluera si l'attractivité du lait de souris de souche C57BL/6 est homogène au cours de la période de lactation pour des souriceaux BALB/c. Chez la souris, comme chez tous les mammifères, la composition du lait change au cours de la lactation. Nous émettons l'hypothèse que d'éventuelles fluctuations olfactives du lait au cours de la période de lactation puissent être détectées par les souriceaux et qu'une préférence soit observée envers des laits plus ou moins appareillés à leur âge. Une telle capacité discriminative serait particulièrement adaptative dans une espèce ayant développé un système d'allaitement communautaire.

II) LES COMPORTEMENTS NEONATALS VIS-A-VIS DE LA TETINE : RECHERCHE DE SUBSTRATS ODORANTS MATERNELS ATTRACTIFS ET APPETITIFS POUR LE SOURICEAU NOUVEAU-NE

1) CARACTERISATION DES SUBSTRATS OLFACTIFS QUI GUIDENT LE SOURICEAU (5-6 JOURS) VERS LA FEMELLE ALLAITANTE

1.1) Introduction

Parmi les mammifères, la mise en place de la communication au sein de la dyade mère-jeune(s) a lieu grâce à des échanges chimiosensoriels. Cependant, seules les études sur le rat ont permis d'éclairer le rôle de certains substrats, comme le liquide amniotique et la salive maternelle, dans l'initiation de la tétée (Blass, 1990 ; Blass & Teicher 1980 ; Pedersen & Blass, 1981; Smotherman & Robinson, 1992; Teicher & Blass, 1976; 1977). Néanmoins, les sécrétions/excrétions présentes sur la tétine n'ont pas toutes été systématiquement testées et seuls certains âges du développement ont été abordés. Il faut garder à l'esprit que les variations sont nombreuses entre espèces (et, au sein même d'une même espèce, entre les classes d'âges et de sexes) et que d'autres espèces de rongeurs, telle que la souris de laboratoire, sont avantageuses pour approfondir l'étude des processus sémiochimiques qui gouvernent les interactions mère-jeunes.

A ce jour, la nature des substrats olfactifs impliqués dans la localisation de la mère et de ses tétines est inconnue chez la souris. La présente étude a donc pour but: 1) d'évaluer le pouvoir attractif des femelles allaitantes pour le souriceau, 2) de localiser la région corporelle la plus attractive pour le souriceau, et 3) d'identifier les substrats olfactifs qui sont à la base de cette attraction néonatale.

1.2) Orientation of newborn mice to lactating females: Identifying biological substrates of semiochemical interest²

Syrina Al Aïn, Amal Chraïti, Benoist Schaal, Bruno Patris

Abstract

Among mammals, odor-based communication between females and infants is decisive for neonatal survival. So far, the nature of odor substrates involved in the localization of the mother and their nipples is unknown in mice. The present study aims: (1) to evaluate the specific attractive value of lactating females to newborn mice, (2) to localize the abdominal region that is most attractive to pups, and (3) to identify odor substrates that support such attraction. Results showed that 5–6-day-old mice roam preferentially over the abdomen of lactating females than the abdomen of non-lactating females. In lactating females, pups are more attracted to abdominal areas comprising nipples. The blend of odor substrates from nipples, as well as separate sources presumed to compose it, viz. milk, maternal saliva and pup saliva, were detectable and equivalently attractive to pups. The equivalent attraction of these different odor substrates may derive either from overlap in chemical constituents, or from associative learning during nursing.

Keywords: mice (*Mus musculus*); newborn; mother–infant communication; olfaction; nipple; milk; saliva

² Article sous presse dans *Developmental Psychobiology*
DOI : 10.1002/dev.21003

INTRODUCTION

Mammals have evolved physiological, cognitive, behavioral, and social mechanisms to optimize the establishment of coordinated relationships between females and their progeny. Basically, females make themselves more or less available to provide protection and care, information, and energetic resources (e.g., Gonzalez- Mariscal & Poindron, 2002; Schaal et al., 2009). Reciprocally, infants' survival and adaptive development depend on their own capacities to exploit the sensory cues broadcast by females before reaching all the matters and commodities they afford. One of the most obvious targets of infant behavior on the mother's body is the nipple (Schaal, 2010). At this outlet structure, neonates get colostrum/milk and associated benefits, in terms of hydration, calories, nutrients, immunity, neural growth stimulation, arousal regulation, hormones, and sensory information (Jensen, 1995). The emphasis here will be on the nipple as a source of information directed to the newborn.

In all species of mammals studied so far, the mammary region, specifically the nipple, has been shown to release odor cues and signals that support neonatal behavior. The experimental alteration of this information (by masking or washing) or of the sensory means to process it (by deprivation of odor inputs or lesion of nasal chemoreception) results in failures to locate the mother or the nipple and in achieving milk intake, ending in weight loss and death (cf. Alberts, 1987; Blass, 1990; Blass & Teicher, 1980; Rosenblatt, 1983; Schaal, 2010). Therefore, chemosensory cues have a critical role in the neonatal ability to locate, orally grasp, and suck a nipple.

Although this process has been studied ethologically in most mammalian taxa, its chemical and chemosensory bases have been thoroughly deciphered in only few cases, mainly the rat, the rabbit, and the human (Schaal, 2010, for review). In their quest for milk, neonatal rats respond to a range of extra-mammary substrates brought there by the dam's self-licking and the pups' sucking; the natural substrates shown to carry behaviorally active compounds were amniotic fluid, maternal saliva, and pup saliva (Teicher & Blass, 1976, 1977). One compound isolated from pup saliva and salivary glands, dimethyl disulfide, was characterized as being reactogenic to neonatal or fetal rat pups (Pedersen & Blass, 1981; Smotherman & Robinson, 1992). In the rabbit, the pups' localization of the nipple is strongly time-constrained and efficient signals are thus emitted to guide searching motions and elicit grasping. These functions appear to be fulfilled by unidentified odor cues emitted on the lactating female's abdomen (Hudson & Distel, 1983) and by a pheromone conveyed through

milk (Schaal et al., 2003). Finally, human infants attend to the odor of their mother's breast while nursing (Doucet et al., 2007; Schaal et al., 2009). The areolar glands of lactating women give off secretions that intensify appetitive oral movements and respiration (Doucet et al., 2009), and the mammary gland itself emits colostrum/milk that appears unconditionally attractive to newborns (Marlier & Schaal, 2005). In sum, the ways through which odor cues are produced and assembled on the mammae/nipples are both diverse between species and complex within species, and provide an interesting opportunity for comparative analyses in chemical communication, maternal behavior, and neonatal cognition (Schaal, 2010).

It is surprising that the mouse (*Mus musculus*), the major mammalian “workhorse” in genetics and developmental, neural and behavioral biology, has been relatively neglected regarding the perceptual bases of early communication in the context of suckling. So far, the origin and nature of the chemical substrates used by newborn mice to reach nipples are unknown. However, the mouse has great potential as a model organism for the appreciation of the semiochemical processes that govern female-offspring interactions, advantageous features being that: (1) newborn mice are born without auditory and visual input (up to Days 9 and 14–15, respectively; Ehret, 1976; Weber & Olsson, 2008); they are thus initially guided by somesthesia and chemoreception, and olfaction remains dominant in the control of behavior in later development (Breen & Leshner, 1977; Hennessy et al., 1980); (2) in contrast to the rat, mouse olfaction and vomerolfaction are dissociable in early development, as the vomeronasal system does not function before birth and remains in an immature condition until puberty (Coppola & O'Connell, 1989; Coppola et al., 1993); (3) the mouse olfactory system functions prenatally (Coppola & Millar, 1997), thus contributing very early to the experiential induction of behavioral phenotypes; (4) postnatally, mouse pups are adept odor learners in the context of nursing or maternal care (Armstrong et al., 2006; Bouslama et al., 2005; Durand et al., 2003) and retain such influences lifelong (Mainardi et al., 1965); thus, the repertoire of salient odor cues can be experimentally controlled in early development; (5) standardized behavioral tests are devised to assess brain function and behavior in adult (Crawley, 2000; van Meer & Raber, 2005) and developing mice (Branchi & Ricceri, 2002); (6) the access to numerous genotypes obtained through artificial selection, knockout or gene transfer (van Meer & Raber, 2005) offers ways to address genetic influences on maternal and pup behavior (Weber & Olsson, 2008), as well as on mammary and milk-related semiochemistry. Finally, (7) another ground to investigate mammary-related semiochemistry in the mouse derives from frequent maladaptive outcomes resulting from genetic manipulations. Such adverse, often lethal,

outcomes generally occur in the earliest stages of development (Branchi & Ricceri, 2002); therefore, a better appreciation of the sensory factors supporting neonatal suckling would be useful to understand and resolve problems with neonatal viability in genetically modified mice (e.g., Hongo et al., 2000).

The present experiments aim to identify maternal odors that likely guide newborns to the nipple and facilitate suckling. It has three related goals: (1) Verify whether lactating female mice (LF) are olfactorily attractive to newborn mice as compared to non-lactating females (NLF); (2) Localize the region(s) on LF abdomen emitting odor cues that are most attractive to pups; (3) Characterize the relative attractiveness of various odor substrates (milk, saliva of lactating females, and saliva of pups) assumed to be present on the LF abdominal skin and nipples.

GENERAL METHODS

Animals and Housing Conditions

Female and male mice (*M. musculus*, BALB/c strain, purchased at Charles River, L'Arbresle, France) were housed together in standard cages (28 cm x 17 cm x 13 cm) in the local breeding unit. Males were left in continuous presence in the cage to favor their parental contribution and ensure conception during postpartum oestrus. To standardize conditions of housing and of pup development (competition), litters were culled to 6 pups. Supernumerary pups (from 1 to 4) were fostered to other LF of the local breeding unit having less than 6 pups (on lactation day 1 or 2). The ambient temperature of the breeding room was set at 21°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). The room was lit on a 12/12 hr light/dark cycle (light on from 12:00 to 0:00 hr). Water and food pellets (Scientific Animal Food & Engineering, Ionisos Aube, Champagne) were available ad libitum. French national and local rules concerning the use of laboratory animals were strictly followed (authorization no. 21 CAE 059).

Test Animals

We tested 320 mice pups on postnatal day (P) 5–6 (the day of birth being recorded as P0). Following pilot-testing, we noted that pups which weighed >3.5 g exhibited optimal motor abilities in our test conditions. Thus, only pups reaching that body-weight criterion were included. Each pup was tested in only one experimental condition. Before the test, the pups

were deprived of contact with the mother for 4 hr to maximize their motivation towards maternal stimuli. To prevent litter effects, we tested a maximum of 4 pups per litter by group; thus, within a same litter, the 6 pups participated in different experiments.

Test Device

To investigate preference behavior in 5–6-day-old mice, we used a test apparatus (**Figure 5**) adapted from those described by Alleva and Calamandrei (1986). This test arena consisted of a rectangular polypropylene box (internal length x width x height: 7.1 cm x 5 cm x 7 cm) with a stainless steel mesh floor (7.1 cm x 5 cm, mesh size: 3.14 mm²). This mesh floor was positioned 2 cm above the bottom. This device was used in two variations of stimuli presentation. In Experiments A and B, the stimuli were presented from below. Both stimuli were exposed under the mesh, being separated by a median polypropylene partition to avoid odor mingling. In Experiment C, the stimuli were presented above the mesh in the corners of the box (see explanations below). To avoid a potential thermal confound influencing the pups' behavior in both compartments, the test arena was placed on a heating plate (28 cm x 20 cm; Gestigkeit, Düsseldorf, Germany). We verified whether the temperature in both compartments was equivalent at the level of the mesh with an infrared camera (FlirTM A320, Flir Systems, Danderyd, Sweden). When the test implied a “warm” (e.g., a live animal) and a “cold” stimulus (e.g., the control stimulus), the test arena was put on two adjacent heating plates (which temperatures were set to equalize the thermal conditions of the mesh floor where the pups were roaming).

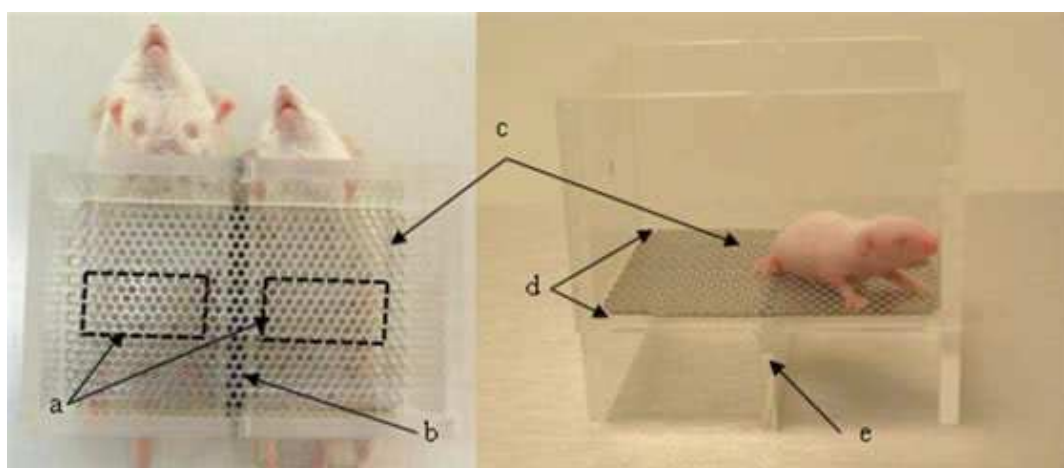


Figure 5. The two-choice device: (a) windows open in Experiment B under the mesh floor on nipple (left) or non-nipple areas (right) of lactating females' abdomens; (b) midline of the arena; (c) stainless steel mesh floor; (d) two ipsilateral corners painted with the same stimulus in Experiment C; (e) median polypropylene partition separating the stimulus females deposited under the mesh floor in Experiments A and B.

Stimuli

In all experiments, the olfactory stimuli were selected to be unfamiliar to the tested pups, that is, the pup's own mother or siblings were never used. The stimuli consisted either in the abdominal odor of LF (on Day 6 or 7 of lactation; in Experiments A and B) or NLF (in Experiment A), in a nonbiological pure odorant (lyral), or in biological odor substrates (i.e., milk, maternal and pup salivas, smears of dorsal skin or of nipples). In experiments A and B, the stimulus females were anaesthetized by an intra-peritoneal injection of a mixture of ketamine (Imalgène 1000, Vibrac, France; 45 mg/kg in NaCl .9%) and xylazine (Rompun 2%, Bayer, France; 5 mg/kg in NaCl .9%). The anesthetic lasted for approximately 45 min. Four to six stimulus females (paired or single) were used by test condition. In Experiment C, the odor substrates were sampled from LF on Day 6 or 7 of lactation (milk, saliva, dorsal skin or nipple smears) or from 5- to 6-day-old mouse pups (saliva).

General Procedure

All behavioral testing of pups was run in a room adjacent to the breeding room to avoid interference with unwanted odors from conspecifics. The tests began at 1.00 p.m. (i.e., at the beginning of the light phase). Before each 2-min test, the arousal of each animal was standardized by stroking it along the back 10 times with a soft paintbrush. Then, the pups were pre-exposed to both stimuli for 6 s to standardize minimal contact with both stimuli. This pre-exposure phase follows a procedure used in paired-odor choice tests in other species (e.g., Macfarlane, 1975; Schaal et al., 1998) to ensure that the subject has had minimal sensory experience with both stimuli before running the actual choice test. The stimulus order of this pre-exposure was counterbalanced within groups. The test itself began when the pup was deposited in the arena with their sagittal line on the midline of the arena. Their roaming in the two halves of the arena was videotaped for 2 min and analyzed with The Observer software (Noldus, Wageningen, The Netherlands). After the tests, all parental pairs with their pups were returned into the breeding room. Pups were separated from their mother for 4 hr before testing to deprive them of suckling, and to maximize their responsiveness. During that pre-test mother-pup separation, the male was kept with the litter, and the cage was put on a heating plate (temperature fixed at 38°C), to limit potential effects of social stress and hypothermia. After the test, before being returned to their home cage, the anesthetized lactating females were gently laid down in an individual cage placed on a heating plate, and observed until complete wake up. No adverse effect of the anesthetic was observed on

maternal and pup behavior. Indeed, the females resumed normal maternal cares (nursing, licking) and all pups were successful in sucking after a time ranging from a few minutes to 2 hr.

Statistical Analyses

In Experiments A and B, we evaluated the pups' side preference using Student's one-sample t-tests (Statistica, Version 8, Statsoft France, Paris), comparing the total duration spent in one half of the arena with the theoretical duration spent there if the animal would have moved at random (i.e., 60 s). In Experiment B, we compared also the time spent by pups over the nipple versus non-nipple windows using Student's paired t-test. In Experiment C, we assessed the pups' preference using Student's paired t-test, comparing the duration of orientation towards both corners smeared with odor. To assess whether the data sets from each group followed a normal distribution, Shapiro-Wilk tests have been used. In all groups, normal distribution was demonstrated (value of w ranging from .929 to .975, in all cases, $p > .05$). To assess potential litter effects, Kruskal-Wallis tests were run. No litter effect reached significance in any experimental group (value of H ranging from 1,455 to 11,960, in all cases, $p > .05$).

EXPERIMENT A: ATTRACTION TO LACTATING FEMALES

Here, we investigated whether lactating females (LF) elicit more attraction in pups than non-lactating females (NLF) on the sole basis of their abdominal odors. A first test ($n = 22$, from 11 litters) assessed whether the pups are able to express selective responsiveness towards the ventral odor of an LF as opposed to that of an NLF. A second test ($n = 20$, from 6 litters) aimed to verify whether the ventral odor of an NLF odor is attractive to pups in presenting it along with the control stimulus.

Methods

Stimuli

The stimuli consisted in unfamiliar LF or NLF. The LF were both pregnant and lactating (Day 6 or 7 of lactation). The NLF were also pregnant to ensure that only the differential effect of the lactational stage was assessed. Both stimulus females were laid supine in either compartment under the mesh of the choice arena. The arena was placed on a heating plate

which temperature was set at 36°C. Only the female's thoraco-abdominal region was exposed, including nipple pairs 2, 3, 4, 5, to avoid odors from the cephalic and ano-genital regions which are not focused on here (i.e., facial glands, urine, and feces). The stimulus females were positioned under the mesh so that the pups could not detect any tactile stimulation. Thermal measurements ascertained equivalent average temperature of the mesh floor area over the LF (Mean $\pm$ SD: 30.84 $\pm$.17°C, n = 5) and the NLF (30.80 $\pm$.12°C, n = 5) (**Figure 6**). The control stimulus was made of a box of polypropylene (5 cm x 3.2 cm x 2 cm), covering the same surface in the experimental device as a supinely laying female's abdomen. To equalize the thermal conditions of the mesh area when it was simultaneously presented with a stimulus female, the control stimulus was placed on a second, adjacent heating plate which temperature was set at 48°C. The control stimulus reached then, on average, 30.9 $\pm$.10°C (n = 5).

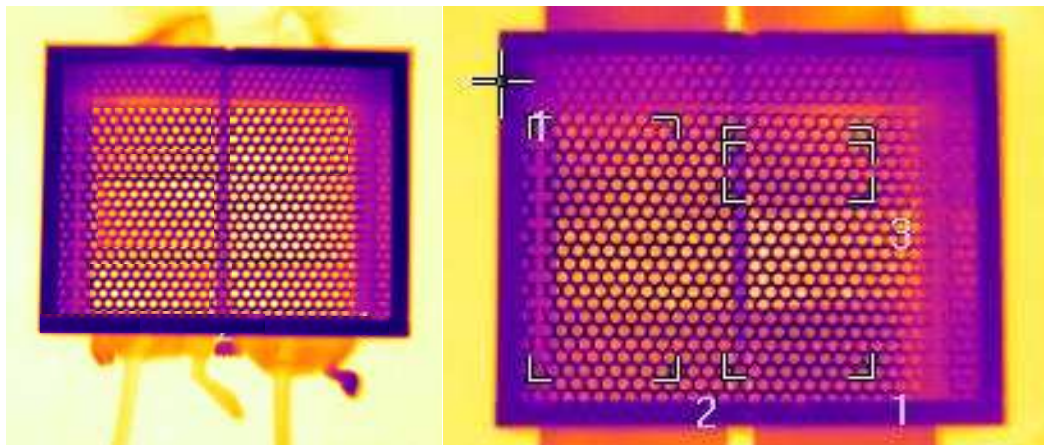


Figure 6. Thermal measurements of the mesh floor area : 1) over the lactating female (left) and the non-lactating female in Experiment A (right), and 2) above the windows opened over the abdomen with (left) or without (right) nipples from a lactating female in Experiment B using an infrared camera (FlirTM A320, Flir Systems, Danderyd, Sweden).

Procedure

Before each test, the pups were successively placed in each compartment of the arena (separated by a movable polypropylene separation) during 6 s to allow exploration of both stimuli before the choice test. The order of this pre-presentation was counterbalanced within groups. Then, they were deposited in the arena (see General Procedure section) and their roaming in the two halves of the arena was videotaped for 2 min. The videotapes were then analyzed to time the pups' presence in each compartment. An animal was considered to be positioned in one half of the arena when its entire muzzle crossed the midline. A pup was excluded from further analyses when it performed less than three such crossings of the midline of the arena.

Results

The pups roamed significantly longer over the abdomen of the LF ($t = 2.441$, $p = .024$, **Figure 7**) when it was presented concurrently with the abdomen of an NLF, suggesting that they can olfactorily discriminate females differing in physiological states, and that they are attracted to the abdominal odors of a LF. When exposed to the odor of the abdomen of NLF opposed to the control stimulus, the pups spent a significantly longer time over the former odor than over the control ($t = 3.437$, $p = .003$, **Figure 7**). Thus, the result of the previous test can be interpreted in terms of preference for the abdominal odor of LF rather than in terms of repulsion from the paired NLF odor. In sum, the present study suggest that female mice emit abdominal odor cues that are detectable to 5–6-day-old pups, and that LF give off more attractive odors than NLF.

EXPERIMENT B: ATTRACTION TOWARDS NIPPLES

The issue assessed here is whether neonatal attraction to LF is caused by odor cues that are uniformly distributed over the female's abdominal skin or whether the nipples emit odors that are more attractive than the surrounding skin. Thus, we measured whether pups ($n = 20$, from 5 litters) express selective responses towards the nipple and the non-nipple areas of LF.

Methods

Stimuli

The pups were tested using two anaesthetized LF whose abdomens were only partially exposed. The two LF were covered with polypropylene plates (5 cm x 3.2 cm) in the middle of which a window (2.5 cm x 1.2 cm) was opened (**Figure 5**). In one female, this window allowed to expose the tested pups to a patch of abdominal skin with the two pairs of inguinal nipples. In the paired female, a patch of skin of similar size, but without nipples, was exposed (i.e., the region between the inguinal and pectoral nipples). Thermal measurements revealed a homogeneity between the temperature of the mesh above the windows opened over the abdomen with ($30.78 \pm .19^\circ\text{C}$, $n = 5$) or without nipples ($30.80 \pm .27^\circ\text{C}$, $n = 5$) (**Figure 6**).

Procedure

The procedure of Experiment A was repeated. In addition to timing globally the pup exploration of each arena compartment, we also measured more restrictively the duration of pup orientation to the skin patches of the females' abdomen made available through the windows (described above). According to the central position of the window in each compartment and to the tendency of pups to stay close to the periphery, the pups were considered as exploring the patch of skin when their muzzle was above or in a rim of 1 cm around the window.

Results

The pups stayed significantly longer in the compartment of the arena exposing nipples than above the compartment exposing the non-nipple regions of LF ($t = 3.457$, $p = .003$, **Figure 7**), and significantly longer over the window exposing the nipples than above the window exposing the non-nipple region (mean $\pm$ SE: 28.6 ± 3.2 vs. 20.3 ± 3.3 s, $t = 2.168$, $p = .043$). Thus, it appears that attractive odor cues are unevenly distributed over the LF abdominal area, and that nipples are involved in this attractiveness.

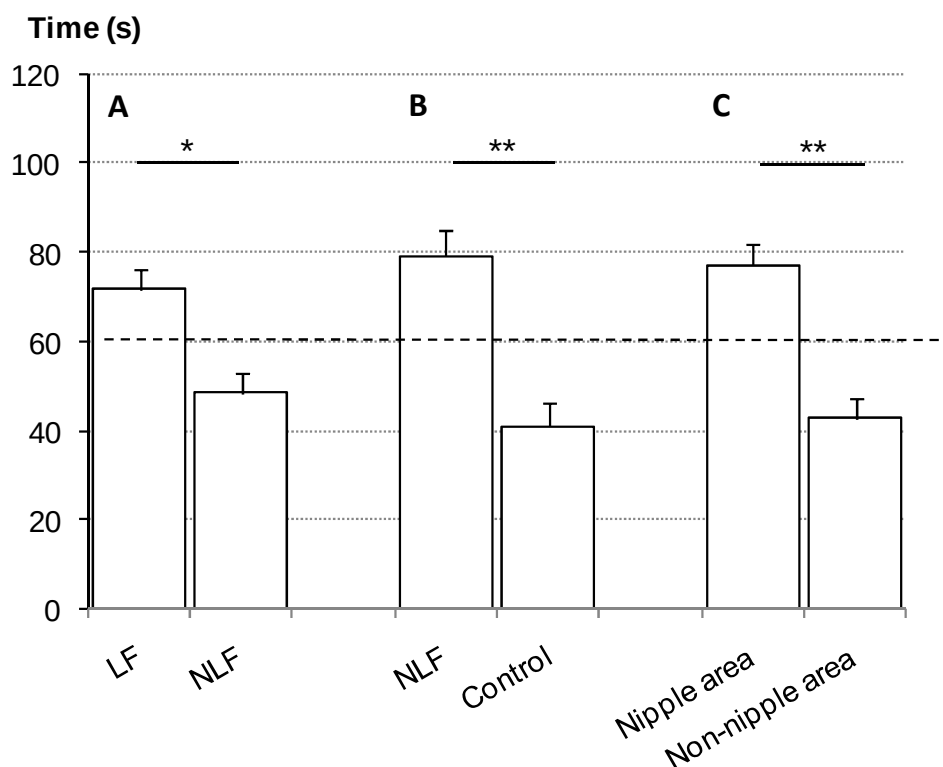


Figure 7. Mean time ($\pm$ SEM) spent in the paired-choice arena by 5–6-day-old pups exposed to: (A) the abdominal region of lactating females (LF) versus the abdominal region of non-lactating females (NLF); (B) the abdomen of NLF versus control stimulus; and (C) an abdominal area of LF comprising nipple versus an abdominal area of LF comprising no nipples. Student's t -test, ** $p < .01$, * $p < .05$. The dashed line indicates the level of random orientation.

EXPERIMENT C: ATTRACTION TO BIOLOGICAL SUBSTRATES PRESUMED TO BE PRESENT ON NIPPLES

The previous experiments showed that some attractive odor substrates are present on the abdomen of LF, and that a more powerful attractive odor is released on or around the nipples. The source, nature, and composite character of this attractive odor are so far unknown, and it is the aim of this experiment to attempt distinguishing between potential odor sources. The candidate odor substrates that could be present on the abdomen and nipples of lactating mice can be classified as either intrinsic or extrinsic (Schaal, 2010). Intrinsic nipple sources are represented by secretions from local skin glands and surface remnants of milk. Extra-mammary sources are represented by substrates left on the nipple and adjacent skin due to self-licking by the female or to sucking by the neonate (i.e., maternal and pup salivas). Here, we aimed to assess the absolute and relative attraction of all these substrates.

Methods

Stimuli

The focal stimuli consisted in: (1) the blend of odor substrates that is present on the nipples of LF mice (so-called “nipple odor”), (2) milk, (3) LF saliva, and (4) pup saliva sampled from unfamiliar LF and from unrelated pups. The control stimuli consisted in: (5) a mouse odor unrelated to nursing, a smear of dorsal skin of LF (so-called “dorsal odor”), (6) lyral, a floral/fruity non-biological aroma (Turetsky & Moberg, 2009) and (7) distilled water. To collect the above samples, the stimulus animals (LF, pups) were isolated approximately 1 hr 30 min before sampling. Nipple and dorsal odors, as well as the saliva of LF and pups, were collected using cotton-tips previously humidified with 10 ml of distilled water. The sampling was performed by gently rubbing the cotton on the nipples or the dorsal skin for 10 s, or by introducing it into the animals’ mouth and leaving it there for approximately 10 s. Regarding the collection of milk, the LF were separated from their litter for 1.5 to 2 hr before being anaesthetized (see General Methods section). The females were then injected intraperitoneally with .15 ml of oxytocin (Intervet International GmbH, Unterschleissheim, Germany) to stimulate milk production. Each nipple was then suctioned with a Pasteur pipette (2 ml) to obtain 10 ml of the fresh milk which was released on the cotton-tip. In total, the mouse milking procedure lasted 15–20 min. Thereafter, the milk sample was immediately used for the tests. Finally, lyral (IFF, Dijon, France) was used in a dilution of 10^{-5} M in water. Its subjective intensity was equated with that of fresh mouse milk (as assessed by 12 human

adults; 5 males, 7 females). Ten microliters of this lyral solution were spiked on the cotton-tip. The scentless control stimulus consisted in 10 ml of water on the cotton-tip.

Procedure

The stimuli to be tested in each paired choice condition were painted with the impregnated cotton-tip on the two ipsilateral corners of the small side of the test arena (**Figure 5**). Then, held by the neck with a gloved hand, the pups were pre-exposed for 6 s at 2 mm from one of the ipsilateral corners painted with each of the two olfactory stimuli. Finally, the pups were deposited in the arena (see General Procedure section) and their roaming in the arena was videotaped for 2 min. A pup was considered as orienting toward a stimulus corner when the tip of its muzzle was within the 1-cm radius to it.

EXPERIMENT C1: RESPONSE TO SEPARATE ODOR SUBSTRATES FROM NIPPLE

Six tests were run with independent groups of pups. Test 1 evaluated the attractive power of the nipple odor ($n = 22$, from 7 litters). Tests 2–4 assessed the pups' ability to express attraction/repulsion towards odor substrates presumed to participate in the nipple odor [milk odor ($n = 18$, from 7 litters), pup saliva odor ($n = 18$, from 7 litters), maternal saliva odor ($n = 19$, from 10 litters)]. Test 5 evaluated the attractive power of a LF odor to which pups were not exposed while suckling, the dorsal odor ($n = 20$, from 8 litters). Finally, test 6, using lyral, evaluated whether pups were indiscriminately attracted by any odor ($n = 20$, from 6 litters). All above odor stimuli were tested here for their absolute attractive power, that is, against the scentless control stimulus (water).

Results

The pups oriented significantly longer to each of the biological odor substrates than to the scentless (water) control stimulus (**Figure 8**): (1) nipple odor ($t = 3.096$, $p = .018$), (2) milk odor ($t = 2.561$, $p = .020$), (3) pup saliva odor ($t = 3.237$, $p = .032$), (4) LF saliva odor ($t = 2.541$, $p = .021$), and (5) LF dorsal odor ($t = 2.377$, $p = .028$). It may thus be concluded that each odor substrate collected from a LF is attractive to P5–6 mouse pups. However, the scented control stimulus lyral was not differentiated from the scentless control stimulus ($t = .121$, $p = .905$), indicating that any odor stimulus did not prove to be attractive to pups.

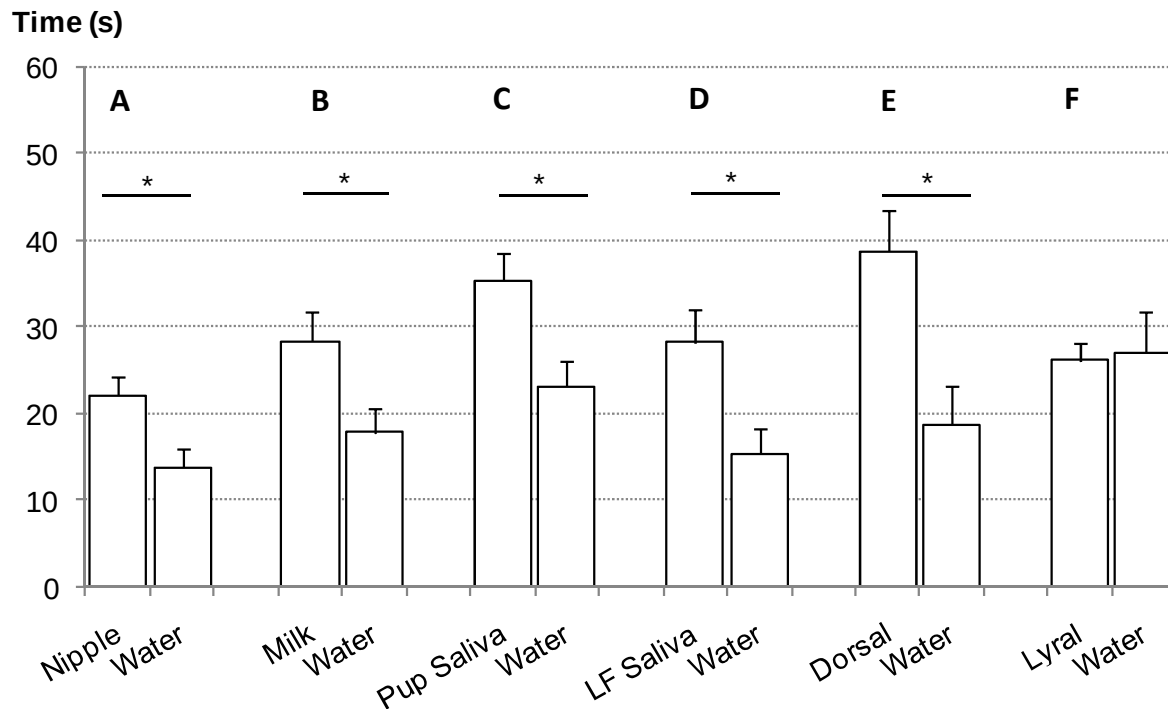


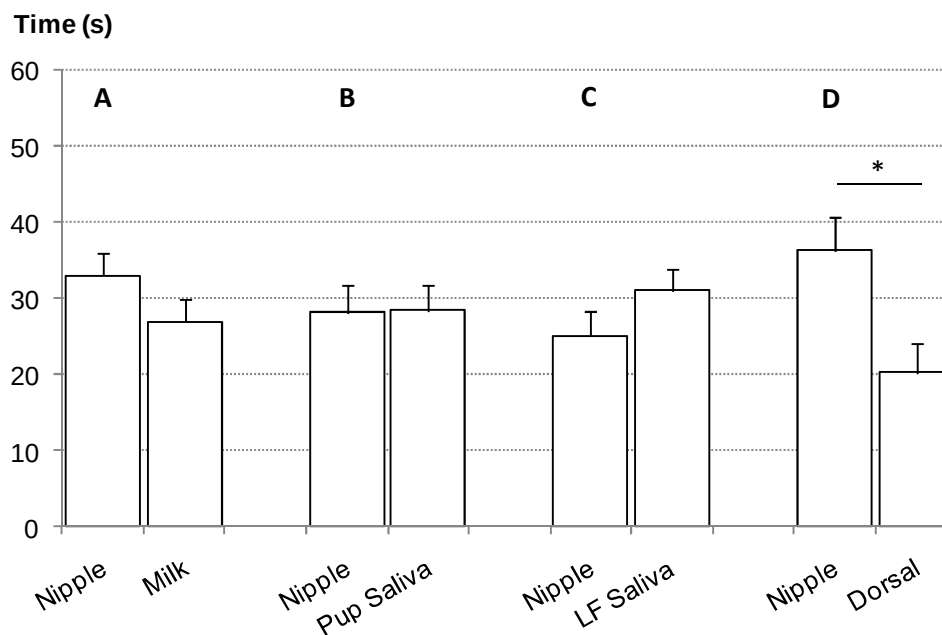
Figure 8. Mean time ($\pm$ SEM) spent by 5–6-day-old pups in an arena which ipsilateral corners were painted with the following stimuli as opposed to the control stimulus (water): (A) lactating female nipple odor (nipple), (B) milk odor (milk), (C) pup saliva odor (pup saliva), (D) lactating female saliva odor (LF saliva), (E) lactating female dorsal odor (dorsal), and (F) the non-specific odorant (lyral). Student's paired t -test, * $p < .05$.

EXPERIMENT C2: RELATIVE ATTRACTION TO WHOLE NIPPLE ODOR VERSUS SEPARATE ODOR SUBSTRATES FROM NIPPLE

Here, we examined the relative attractiveness of the odor substrates tested previously (viz., milk odor, pup saliva odor, LF saliva odor, dorsal odor) and the blend that is assumed to be naturally present on the nipple (viz., nipple odor). Four tests aimed to compare the relative attractive potency of the nipple odor when it was paired with: (1) milk odor ($n = 18$, from 9 litters), (2) pup saliva odor ($n = 20$, from 7 litters), (3) LF saliva odor ($n = 20$, from 6 litters), and (4) dorsal odor ($n = 23$, from 7 litters). This last stimulus was taken as a control stimulus that is not closely associated with suckling.

Results

Results are depicted in **Figure 9**. The mouse pups approached the nipple odor as much as the odor of milk ($t = 1.190$, $p = .249$), pup saliva ($t = .045$, $p = .965$), and LF saliva ($t = 1.078$, $p = .294$), whereas they approached significantly less the dorsal odor ($t = 2.170$, $p = .041$). Thus, nursing-deprived mouse pups expressed similar levels of attraction to any odor from LF, but only when these odors were contingent with suckling.



Figure

9. Mean time ($\pm$ SEM) spent by 5–6-day-old pups in an arena which ipsilateral corners were painted with the following stimuli as opposed to the lactating female nipple odor (nipple): (A) milk odor (milk), (B) pup saliva odor (pup saliva), (C) lactating female saliva odor (LF saliva), and (D) lactating female dorsal odor (dorsal). Student's paired t -test, * $p < .05$.

EXPERIMENT C3: RELATIVE ATTRACTION BETWEEN SEPARATE ODOR SUBSTRATES FROM NIPPLE

Tests C2 reported that the odors of milk, pup saliva and LF saliva were as attractive as the whole odor blend present on the nipples. This may be explained by the fact that each odor substrate may contribute to the attraction of the nipple odor. The present tests aimed to assess whether these different odor substrates contribute equally to the attractiveness of the nipple. A further series of tests intended to verify whether pups are differentially attracted to: (1) milk odor versus pup saliva odor ($n = 20$, from 11 litters), (2) milk odor versus LF saliva odor ($n = 21$, from 9 litters), and (3) pup saliva odor versus LF saliva odor ($n = 19$, from 7 litters).

Results

Figure 10 shows that the pups oriented equivalently to the odors of milk when presented against pup saliva ($t = .198$, $p = .845$), or against LF saliva ($t = .853$, $p = .404$). Further, pups were also equally attracted to pup saliva odor and to LF saliva odor ($t = 1.297$, $p = .211$).

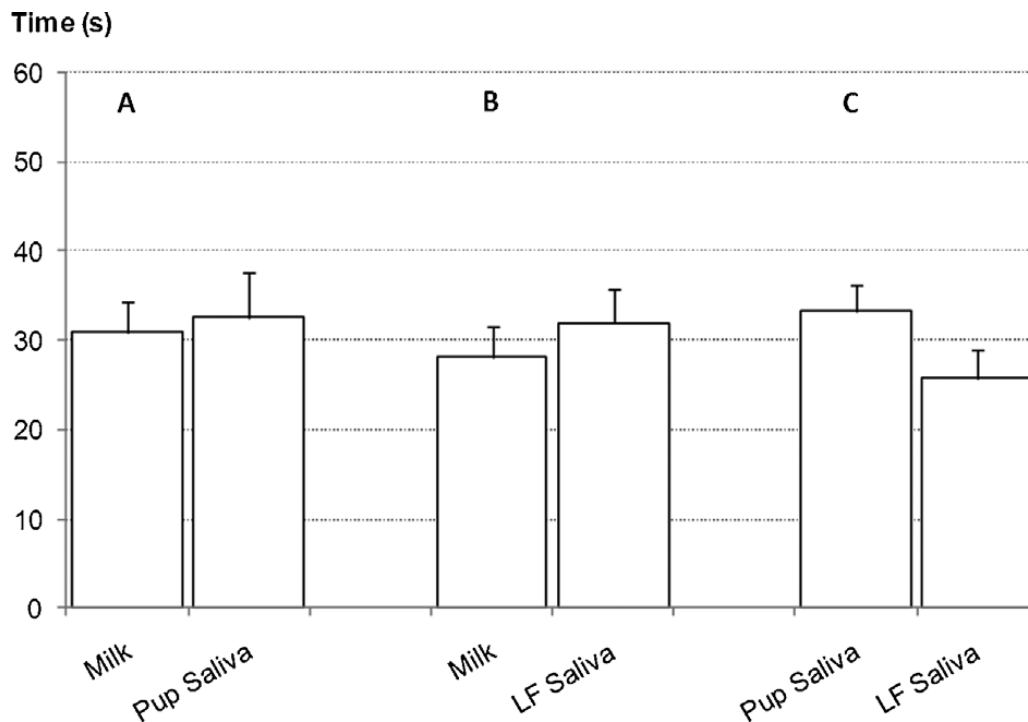


Figure 10. Mean time ($\pm$ SE) spent by 5–6-day-old pups in an arena which ipsilateral corners were painted with the following pairs of stimuli: (A) milk odor (milk) versus pup saliva odor (pup saliva); (B) milk versus lactating female saliva odor (LF saliva), and (C) pup saliva versus LF Saliva.

DISCUSSION

The present research aimed at characterizing sources of odor cues that might explain orientation and efficient nipple localization performance of 5–6-day-old mouse pups. Such pups detect the odor of the abdomen of LF and NLF, but they are more attracted to the abdominal region of the former than of the latter. This pattern of response corroborates previous data in mice (Breen & Leshner, 1977) and other rodents (rat: Leon & Moltz, 1971; spiny mouse: Porter & Doane, 1976). Semiochemical processes may involve changes relative to the female's abdominal odor in general and to her nipples in particular, or to changes relative to the pups' activity in contact with the mother's ventrum.

Lactating Females Are Olfactorily Different

Regarding changes inherent to the female, generalized effects are related to the late gestation/early lactation endocrine profile which is known to affect the structure and activity of skin glands. Evidence for such lactation-related functional changes is scarce in the mouse, but homologous phenomena in other mammals indicate higher attractiveness of abdominal odor (rabbit: Hudson et al., 1990), or elevated excretion rate of sebum (women: Burton et al., 1975). Some of these changes may be peculiar to nipples. In the mouse, the nipples are altered in size and surface microstructure during the first days of lactation (Toyoshima et al., 1998), and the number and size of nipple's sebaceous glands increase on Day 17 of gestation and remain elevated up to Day 18 of lactation, indicating increased sebum excretion (Koizumi et al., 2003). In addition, nipples are obviously particular as they emit colostrum/milk which are odorous (in our own experience, fresh mouse milk has a distinctive scent). Beside such local effects mediated by mammary exocrine structures, behavior also participates in shaping the chemosensory properties of the females' abdomen and nipples. Self-licking of the abdomen and nipple-line by females increases during late pregnancy and lactation (mice: Harvey & Mann, 1987; rats: Roth & Rosenblatt, 1967; Serafim & Felicio, 2002). Additionally, self-licking or licking of pups may contribute to spread ventrally either the females' own facial, anogenital and urinary substrates, or substrates emitted by pups (e.g., amniotic fluid, urinary/fecal substrates). Thus, LF may create a highly specific and temporally dynamic abdominal odor pattern. Finally, the pups' activity on the LF abdominal surface, and more insistently on the nipples, may also contribute to the local odor differentiation through inevitable spreading of saliva and of the saliva-milk coagulate. Thus, the potential odor sources of LF abdomen point to the nipples as a major locus of odor production and mixing.

Nipples as Olfactory "Hotspots"

In Experiment B, the pups preferred to stay closer to a LF abdominal area supplied with nipples as opposed to a non-nipple area. Again, this result is corroborative of previous data in mice (Hongo et al., 2000) and rats (Blass et al., 1977; Singh & Hofer, 1978; Teicher & Blass, 1976). Thus, nipples are semiochemically peculiar to previsual newborn pups. They concentrate mammary and extra-mammary cues spread there by pups' sucking. In addition, due to their highly wrinkled microtexture (Toyoshima et al., 1998), mouse nipples appear well suited to sequester biological secretions, as well as the microflora that lives on them and releases volatile compounds from involatile precursors (e.g., milk lipids, salivary proteins). In

sum, nipples may constitute olfactory/tactile spots that newborn pups track in their pre-nursing searching behavior. These odor spots may be sensorily effective for pups by qualitative, quantitative, or both, deviations from the more homogeneous odor background of the LF abdomen. Qualitative variations would involve that compounds present over nipples differ from those on surrounding abdominal fur, while quantitative variations would involve that the same compounds are there, but in higher concentrations. Such a nipple-centered odor intensity gradient effect was previously suggested in the mouse (Hongo et al., 2000). Another way to establish an odor gradient around the nipples is to create local conditions of radiating warmth which affects the volatility of the compounds present on the skin (Schaal et al., 2009). This could be realized by spots of higher dermal vascularization more or less centered on the nipples, so that nipples emerge in zones of higher surface temperature (Hofer et al., 1976). In sum, while the non-nipple ventral skin is not devoid of attractive potency to newborn mice, the ventral skin bearing nipples elicits about twice as much approach time. Thus, in addition to their tactile and perhaps thermal salience, nipples have got particular olfactory salience for 5–6-day-old pups.

Equivalent Attractiveness of Intrinsic and Extrinsic Mammary Odors

Experiment C explored the nature of the cues involved in mouse pup orientation to the nipple. All intrinsic and extrinsic mammary odors substrates considered (i.e., whole nipple, milk, maternal and infant salivas) revealed to be attractive against water. When the whole nipple odor was taken as a reference stimulus against which to assess the behavioral activity of the odor substrates presumed to enter in its composition, it appeared that milk and both salivas were as attractive as it. It appeared first that fresh mouse milk odor triggered positive orientation in mouse pups, a result which was unprecedented to the best of our knowledge. More generally, data seem lacking on the behavioral effects of conspecific milk in rodents, rat newborns having indeed mostly been investigated for their responses to bovine milk generally administered per os (Cheslock et al., 2000; Petrov et al., 1997; 1999; Smotherman et al., 1997; but cf. Small, 1899, and Singh & Hofer, 1978 for attempts). However, work in other mammals demonstrates specific behavioral activity of homospecific milk or mammary secretions (e.g., rabbit: cf. Coureaud et al., 2003; Keil et al., 1990; Schaal et al., 2003; humans: Doucet et al., 2009; Marlier & Schaal, 2005), and points to a topic that is worth

studying in rodents. Secondly, maternal and pup salivas did also release neonatal approach responses, corroborating earlier studies in rats and gerbils (Block et al., 1981; Teicher & Blass, 1976, 1977).

Mechanisms Involved in the Attraction of Nipple Odors

All odor substrates presumed to be spread on the nipple, and studied separately in Experiment C, were as potent to elicit pups' approach response as the reference nipple odor, and they were all equally attractive when paired two by two. This result can be interpreted in several ways. First, all of these substrates may convey common compounds and, hence, overlap olfactorily. It is indeed probable that maternal milk and saliva share volatiles derived from food or general metabolism (e.g., Bronstein et al., 1975; Galef & Henderson, 1972), and that LF increase such overlap while self-licking. In the same way, suckling pups may impregnate nipples with their saliva, as well as with remnants of the saliva-milk mixture. Such overlap in compounds bearing high olfactory impact in different biological substrates was described in other species [i.e., in humans, odorous steroids occur in axillary sweat, saliva, milk and amniotic fluid (Bird & Gower, 1983; Doucet et al., 2009; Nixon et al., 1988), and 3-methyl-2-hexenoic acid is detected in axillary sweat, saliva, nasal mucus and tears (Spielman et al., 1995)]. Second, all of these odor substrates may have got similar reinforcing value because they were encoded in similar exposure conditions [either prenatally or postnatally by association with the same rewarding endpoints (viz., warmth and comfort contact, satiation)]. Fetal- and suckling related odor learning is indeed a general phenomenon in mammalian perinates (e.g., Alberts, 1987; Blass, 1990; Rosenblatt, 1983; Schaal, 2005), and it can result in the assignation of equivalent reinforcing value to functionally different odor cues (viz., natural cues or artificial odorants). This was shown in rodents (mainly the rat; e.g., Cheslock et al., 2000; Johanson & Hall, 1979), lagomorphs (Coureaud et al., 2006a; Hudson et al., 2002; Patris et al., 2008), or primates (Delaunay- El Allam et al., 2006; 2010). In addition, besides sucking-induced odor preference, newborn mice also develop a preference for odorants linked with aspects of maternal care and suckling, such as ano-genital licking or its simulation through stroking with a soft paintbrush (Armstrong et al., 2006; Bouslama et al., 2005; Durand et al., 2003). This interpretation is reinforced by the fact that the dorsal odor from LF (Experiment C2), not associated with nursing, is less attractive to pups. All these results indicate that the multisensory context of nursing, and milk itself, are potent reinforcers of any associated odor. Hence, being exposed for most of their interactions with the mother to

the blend formed by mammary and extra-mammary odors, mouse pups exhibit undifferentiated attraction to all the substrates considered here.

In conclusion, the present study identified odor substrates potentially involved in the nipple localization in mouse pups. The present experiments being run in pups aged 5–6 days, the present pattern of results may result from their intensive exposure to all these odor substrates in highly rewarding conditions. Thus, upcoming work should substantiate whether these odor substrates are already attractive in newly born pups, before exposure to the nursing context broadens the repertoire of salient odor cues, but also in later developmental stages which imply new social and physiological adaptations. Moreover, further study should investigate the involvement of each substrate tested here in the pup's ultimate adaptive behavior of grasping and suckling the nipple.

1.3) Conclusion

Le premier résultat majeur de cette étude met en lumière le pouvoir olfactif de la femelle allaitante, et plus particulièrement de ses tétines, chez des souriceaux de 5-6 jours. Ceux-ci préfèrent explorer : 1) l'odeur émise par une femelle allaitante à celle d'une femelle non allaitante, 2) la région abdominale comportant des tétines par rapport à une région abdominale dépourvue de tétines, chez des femelles allaitantes, et 3) le frottis prélevé à la surface de la tétine par rapport à un frottis réalisé sur le pelage du dos chez une même femelle allaitante. Nous pouvons conclure que les souriceaux de 5-6 jours s'orientent préférentiellement vers la région abdominale de femelles allaitantes, et que les composés actifs sont émis sur ou autour des tétines. Comme la plupart des espèces mammifères, la zone mammaire de la souris allaitante, apparaît donc comme une zone olfactive privilégiée qui guide les nouveau-nés (Doucet et al., 2007 ; Hongo et al., 2000 ; Morrow-Tesch & McGlone, 1990 ; Singh & Hofer, 1978; Teicher & Blass, 1976 ; 1977; Vince & Ward, 1984).

De plus, cette structure saillante regroupe une variété de substrats maternels et infantiles, tels que le lait, la salive maternelle et la salive infantile. Chacun de ces substrats est attractif lorsqu'il est présenté séparément. De façon surprenante, leur pouvoir attractif est similaire lorsqu'ils sont présentés simultanément par paire, pour des souriceaux expérimentés de 5-6 jours. En effet, nous nous attendions à ce que l'odeur du fluide nutritif soit préférée à celles des odeurs salivaires pour des souriceaux privés de leur mère et donc de lait pendant 4 h. Deux mécanismes sont toutefois susceptibles d'expliquer cette équivalence d'attractivité observée entre les substrats considérés : la présence de composants attractifs communs à ces substrats (arômes alimentaires), et leur apprentissage sous l'emprise des mêmes renforcements positifs lors des tétées.

Au vu de ces résultats, deux questions peuvent être soulevées: 1) Ces substrats sont-ils attractifs pour des souriceaux sans expérience de tétée, qui n'auraient donc pas encore pu associer ces odeurs au contexte renforçateur de l'allaitement; 2) Ces substrats olfactifs sont-ils impliqués, outre l'attraction, dans le déclenchement du comportement de saisie de tétine chez le souriceau?

Des expériences complémentaires ont été réalisées et sont décrites dans l'Annexe 1.

2) NATURE DES SUBSTRATS OLFACTIFS QUI DECLENCHE LA SAISIE ORALE DE LA TETINE CHEZ LE SOURICEAU A LA NAISSANCE

2.1) Introduction

Nous avons précédemment établi que les odeurs de lait, de salive maternelle et de salive infantile sont impliquées dans l'orientation néonatale. Nos connaissances les plus complètes du comportement néonatal dans le contexte de tétée, et de la composition des indices olfactifs émis par la femelle allaitante, sont limitées à certaines espèces de mammifères, comme le rat, le lapin et l'humain (Schaal, 2010). La nature des sources et/ou des indices olfactifs qui régulent le comportement de tétée sont spécifiques. Le **fluide amniotique** est un substrat qui déclenche les réponses avides des nouveau-nés à la naissance et dans les premiers jours qui suivent (la souris : Kodama, 1990; rat : Arias & Chotro, 2007; Blass, 1990; Blass & Teicher, 1980; Korthank & Robinson, 1998; Mendez-Gallardo & Robinson, 2011; Teicher & Blass, 1977 ; lapin : Coureaud et al., 2002 ; mouton : Vince & Ward, 1984 ; et humain : Marlier et al., 1997 ; 1998 ; Schaal et al., 1995a). De plus, les composés volatiles véhiculés par le **lait homospécifique** déclenchent également de fortes réponses comportementales appétitives de la part des nouveau-nés (humain: Marlier & Schaal, 2005; Raimbault et al., 2007; lapin : Keil et al., 1990; Coureaud et al., 2001 ; porc : Parfet & Goyou, 1991 ; mouton : Schaal et al., 1995b ; Vince & Ward 1984). Enfin, la **salive maternelle** contribue à déclencher la première saisie de tétine des ratons à la naissance (Teicher & Blass, 1977).

Dans le but de développer un nouveau modèle mammalien de la régulation chimiosensorielle de la saisie et de la succion de la tétine, nous avons mené une étude sur la souris de laboratoire nous inspirant des méthodes élaborées par de précédentes études chez le rat (Blass, 1990; Blass & Teicher, 1980; Hofer et al., 1976; Singh & Hofer, 1978). L'objectif est d'identifier les substrats olfactifs biologiques qui initient la saisie de la tétine chez le souriceau : a) en isolant différents substrats olfactifs d'origines maternelle ou infantile localisés sur la zone mammaire, et b) en caractérisant à partir de quel moment ces substrats sont actifs pour le souriceau. Afin d'examiner l'implication de l'apprentissage, les réponses de saisie orale des souriceaux face à divers substrats présents sur la tétine ont été évaluées juste après la naissance (avant et après la première expérience de tétée) et à 1 jour de vie postnatale (après une expérience de tétée).

2.2) How does a newly born mouse get to the nipple? Odor substrates eliciting first nipple grasping and sucking responses³

Syrina Al Aïn, Laurine Belin, Benoist Schaal, Bruno Patris

ABSTRACT

It is a mammalian female strategy to emit odor cues and signals that direct their inexperienced newborns to the nipple, and optimize their initial sucking success and, hence, viability. Here, natural odorous substrates that contribute to nipple grasping were investigated in mice, a species that has not been much scrutinized on this topic. The response of pups toward the nipples of lactating females (LF) versus non-lactating females (NLF) were first assessed right after watched birth, before and after the first suckling experience, and at 1 day old, after more extended suckling experience. It appeared that only nipples of LF induced grasping at these early ages, leading to take NLF as the baseline setting to present various odor substrates sampled from LF, viz. amniotic fluid, murine milk, LF saliva, pup saliva, LF urine, and an odorless control stimulus (water). Results indicate that: (1) only amniotic fluid and fresh milk induced nipple grasping before the first suckling experience; (2) LF saliva started inducing grasping after the first suckling experience; (3) pup saliva released grasping after 24–36 hr of suckling experience; finally (4) neither LF urine, nor water induced any nipple grasping. In conclusion, the activity of amniotic fluid and murine milk on neonatal pup behavior before any postnatal suckling experience suggests that either prenatal learning and/or predisposed olfactory mechanisms do operate, while the behavioral activation due to maternal and infantile salivas clearly depends on postnatal exposure.

Keywords: mouse (*Mus musculus*); newborn; olfaction; amniotic fluid; colostrum; milk; saliva; urine; mother–infant interactions

³ Article sous presse dans *Developmental Psychobiology*
DOI : 10.1002/dev.21082

INTRODUCTION

Immediately after birth, mammalian neonates must efficiently interact with the mother to obtain care and energy (e.g., Blass, 1990; Blass & Teicher, 1980; Rosenblatt, 1983; Schaal, 2005; Schaal et al., 2009). Thus, initial survival depends strongly on the neonates' ability to focus on nipples or teats while interacting with the mother. The success of the first suckling episode has indeed multiple vital consequences for neonates as it satisfies their systemic needs of hydration, nutrition and metabolism, passive immunity, growth stimulation, bacterial transfer, regulation of behavior, and learning of mother- and milk-related cues. Females have evolved to deliver all complimentary matters and physiological and behavioral commodities to optimize the success of their immature newborns' efforts to reach their nipples, extract colostrum/milk and convert it into biomass. In particular, females present themselves to their offspring with conspicuous nipples, and neonates exploit this conspicuousness in using the sensory abilities that control most their perceptual activity based on somesthesia and olfaction. Lactating dams emit indeed a range of odorous substrates in association with their nipples. These odorous substrates can be classified as either intrinsic (colostrum/milk and secretions from mammary skin glands) or extrinsic (substrates from non-mammary sources spread on the nipple by the female and the suckling pups) (Schaal, 2010). Here, we will highlight the nipple as a salient source of olfactory information that motivates and provides sensory beaconing to newborns in their very first directional efforts and motivation to orally grasp it and express sucking.

Although nipple seeking and sucking behavior has been studied in representative species of most mammalian taxa, its sensory regulation remains unclear. Our current understanding of neonatal behavior in the context of suckling, and of the origin and composition of odor cues emitted there is currently limited to only very few mammalian taxa, including rodents (rat), lagomorphs (rabbit), and primates (human) (reviewed in Schaal, 2010). In the most thoroughly studied rat, the first nipple grasping response could be reinstated on an odor-deactivated nipple by painting it with a distillate of nipple wash, saliva of parturient dam, or amniotic fluid (Teicher & Blass, 1977); in 2-day-old rat pups, nipple grasping was also elicited by a distillate of the nipple wash, but also by rat pup saliva, or a compound isolated from it, dimethyldisulfide (DMDS) (Blass & Teicher, 1980; Pedersen & Blass, 1981; Teicher & Blass, 1976). In the rabbit, newly born pups grasp nipples under the influence of odor compounds emitted over the nipple skin (Coureaud et al., 2001; Hudson & Distel, 1983), and they are also very eager to seize any object that is endowed with fresh rabbit milk (Coureaud

et al., 2001; Keil et al., 1990). One compound in rabbit milk, the so-called mammary pheromone 2-methyl-but-2-enal (2MB2), has been shown to carry very robust behavioral potency for newly born pups (Schaal et al., 2003), and this compound appears to be emitted into ejected milk in the distal part of the milk ducts (Moncomble et al., 2005). Finally, human infants exhibit clear attraction to the odor of the nipple/areola region (Doucet et al., 2007; Schaal et al., 2006), as well as to the odor mixture carried in colostrum and milk (Marlier & Schaal, 2005; Raimbault et al., 2007), and in the secretion of Montgomery's glands situated on the areolae (Doucet et al., 2009; Schaal, et al., 2008b). Undefined compounds in these secretions elicit increased oral activity in newborn infants, even when they were never exposed to the breast beforehand (Doucet et al., 2009).

The nature of the salient odor cues and the mechanisms supporting localization and grasping of nipples are different in the species studied so far, although any valid comparison appears limited because current data result from methodologically heterogeneous approaches. In an effort to develop an additional mammalian model of chemosensory control of nipple grasping and sucking, a series of experiments was conducted on the laboratory mouse using approaches modeled on previous investigations in the rat (Blass, 1990; Blass & Teicher, 1980; Hofer et al., 1976; Singh & Hofer, 1978). Despite extensive characterization of neural and genetic bases of its behavior (Dragatsis et al., 2004; Hedrich & Bullock, 2004; Hongo et al., 2000), the mouse remains poorly investigated regarding the chemosensory bases of early adaptive behavior. As it represents an excellent model system to decipher the semiochemical processes that govern mating and related endocrine bases (e.g., Hurst, 2009; Keller et al., 2009; Martinez-Garcia et al., 2009), the mouse appears also especially valuable to understand the nature of chemical cues and signals that govern mother–infant interactions. First, highly altricial neonatal mice are predominantly led by means of somesthesia and olfaction (König & Markl, 1987; Weber & Olsson, 2008). Their nasal chemoreception operates from embryonic day (ED) 18, except their vomeronasal system that does not appear to function before birth and remains in an immature condition until puberty (Coppola & O'Connell, 1989; Coppola & Millar, 1997). Mouse pups might therefore encode essential odor information through their main olfactory system during the fetal and perinatal period (Kodama, 1990; Nolte & Mason, 1995; Oostindjer et al., 2011; Patris et al., 2009; Todrank et al., 2011; Youngentob & Glendinning, 2009). Finally, neonatal mice perceive and learn novel odorants used as cues during suckling and associated maternal care (Armstrong et al., 2006; Bouslama et al., 2005; Durand et al., 2003).

Several studies demonstrated that mouse pups do react to the odor of the biological fluids to which they are exposed during typical development. They preferentially suck nipples coated with amniotic fluid (Kodama, 1990) and show attraction toward the whole nipple odor of lactating females (LF), as well as to the odors of murine milk, LF saliva and pup saliva (section II.1). But being several days old, the pups in these earlier studies had many opportunities to acquire these stimuli as attractive in the rewarding context of suckling. These results may thus not be generalizable to younger pups which have only minimal or no suckling experience.

Accordingly, the present study aims at identifying odor substrates that elicit oral grasping in newborn pups before and after they had extensive exposure to suckling. It will have the following objectives. Experiment 1 will assess whether mouse pups respond differentially to the nipples of a LF and of a non-lactating female (NLF) in order to evaluate whether LF are olfactorily unique for pups at their very first suckling experience. Experiment 2 aims to characterize some biological substrates that are assumed to be present on the nipple of a LF, and that are known to be behaviorally attractive in older mouse and rat pups (viz., amniotic fluid, murine milk, LF saliva, pup saliva, and LF urine). This second experiment aims also to appreciate the involvement of experience in the initiation of sucking behavior after birth.

ANIMALS AND METHODS

Housing Conditions

The French national and local rules concerning the use of laboratory animals were strictly followed (authorization no. 21 CAE 059). The mice (*Mus musculus*, BALB/c strain, purchased at Charles River, L'Arbresle, France) were paired and housed together in standard cages (28 cm x 17 cm x 13 cm) in the local breeding unit. Males were continuously left with the females for their parental contributions and to ensure fecundation after parturition. The ambient temperature of the breeding room was set at 22°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). The lights was set on a 12:12 hr light:dark cycle (Light on at 8 a.m.).

Water and food pellets (Scientific Animal Food & Engineering, Ionisos Aube, Champagne) were available *ad libitum*.

Test Conditions

This study consisted of two experiments. Experiment 1 contrasted the reactogenic potency of the whole-nipple odor of LF against the same odor of NLF. Experiment 2 consisted in assessing the differential behavioral activity of different substrates that should logically be on the nipples of LF due to lactation and species-typical maternal and infant behavior (self-licking, sucking). The principle of both experiments consisted in exposing test pups of varying age/experience to the olfactorily intact nipples of stimulus-females (Experiment 1) or to the nipples of stimulus-females after they were smeared with various secretions/excretions from donor animals (Experiment 2).

Test Animals

The tested pups were distributed in 3 experimental groups as a function of age and exposure to suckling: (1) Group P0: 5- to 7-hr-old pups without any suckling experience; their birth was directly watched by an experimenter who then separated the litter from the mother right after the completion of initial maternal behaviors (placenta and umbilical cord eating and licking) but before any suckling bout occurred (no milk observed in the stomach by transparency through the abdominal skin); (2) Group P0+: 5- to 8-hr-old pups with 1–4 hr suckling experience; these pups were separated from the mother just after the first suckling bouts (milk observed in their stomach); and (3) Group P1: 24- to 36-hr-old pups with more extended suckling experience. The two first age groups were chosen to assess the possibility of fast learning of nipple-related odor cues after the first interactions with the mother and ingestion of milk. The third age group was intended to evaluate potential behavioral changes due to neural maturation and/or accumulated experience through repeated nonnutritive and nutritive reinforcement. Each pup was tested in only one experimental condition. The tested pups came from litters of 4 to 8 pups and a maximum of 4 pups per litter were tested by group/condition. In total, 506 pups were tested in both experiments. In Experiment 1, the following numbers of pups in the 3 experimental groups were tested on LF nipples (P0: n = 20 pups, from 6 litters (thereafter noted 20//6); P0+: 21//7; P1: 23//8) and on NLF nipples (P0: n = 20//6 litters; P0+: n = 20//6; P1: n = 20//8). In Experiment 2, the group sizes tested on NLF nipples painted with the different substrates were: amniotic fluid (P0: n = 24 pups from 6 litters; P0+: 20//8; P1: 21//6), milk (P0: 20//6; P0+: 20//6; P1: 20//5), LF saliva (P0: 24//10; P0+: 24//12; P1: 20//7), pup saliva (P0: 20//8; P0+: 21//7; P1: 28//7), LF urine (P0: 20//6; P0+: 20//6; P1: 20//6), water (P0: 20//6; P0+: 20//7; P1: 20//7).

Stimuli

Stimulus Animals. In Experiment 1, the stimuli consisted in olfactorily intact nipples (i.e., devoid of experimental treatment) in the context of the females' abdomen. The nipples of LF or NLF were directly presented under the pups' muzzle. For the testing of the pups in the P0, P0+ and P1 groups, we used 6, 8, and 9 LF stimulus-females, and 6, 6, and 8 NLF stimulus-females, respectively. In Experiment 2, the stimulus-females consisted only in NLF which nipples were painted with various biological substrates that are expectably present on the nipples of a LF. In total, 49, 57, and 48 stimulus-females were used to test the pups from P0, P0+, and P1 groups, and 5 to 11 stimulus-females were used per test condition.

Donor Animals-Biological Substrates. The biological substrates tested in Experiment 2 were collected in the following conditions: Amniotic fluid. Fifteen donor females on days 10–15 of gestation (5, 5, and 5 donor LF used for P0, P0+, P1 groups, respectively) were anesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (Imalgène 1000, Vibrac, France; 69 mg/kg body weight) and xylazine (Rompun 2%, Bayer, Puteaux, France; 1.38 mg/kg body weight) and then euthanized by cervical dislocation. Their amniotic sacs were externalized using established surgical techniques (Smotherman et al., 1984) to aspirate the amniotic fluid (untainted with blood) with a Pasteur pipette (2 mL) through the amnion. This entire procedure was completed within 15 min during which .5–1.5 mL of amniotic fluid was collected per female and aliquoted into glass vessels kept on ice.

Milk. Eighteen donor LF (6, 7, and 5 donor LF used for P0, P0+, P1 groups, respectively) were separated from their litter for 1.5–2 hr before being anaesthetized (see above). The females were then intraperitoneally injected with .15 mL of oxytocin (Intervet International GmbH, Unterschleissheim, Germany) and gently massaged on the mammary areas for 5 min to stimulate milk production. Each nipple was then aspired with a Pasteur pipette (2 mL) to obtain fresh milk. During the 15-min milking procedure, .5–1 mL of milk was collected and aliquoted into glass vessels kept on ice (**Figure 11**).

Salivas. The tip of a glass stick was delicately introduced into the animals' mouth [28 donor LF and 69 donor pups (10, 11, and 7 LF and 20, 21, and 28 pups used for P0, P0+, P1 groups, respectively)] and held there for approximately 15 s (glass stick diameter for sampling in the LF and in the pup: .4 and .1 cm, respectively; **Figure 11**).

Urine. Eighteen donor LF (6, 6, and 6 donor LF used for P0, P0+, P1 groups, respectively) were laid on a clean glass surface at room temperature to stimulate spontaneous urination; the fresh and clean urine left on the glass surface was then pipetted into glass vessels.

Amniotic fluid, milk, and urine were kept in a glass vessel maintained in ice until use within an hour after sampling. The saliva of pups and females were used right after sampling. In all tests, the olfactory stimuli were unfamiliar to the tested pup, that is the pup's own mother or siblings, or their respective secretions or excretions, were never used. The stimulus-females and donor animals were matched in postpartum/ postnatal age with the tested pups (except for amniotic fluid).

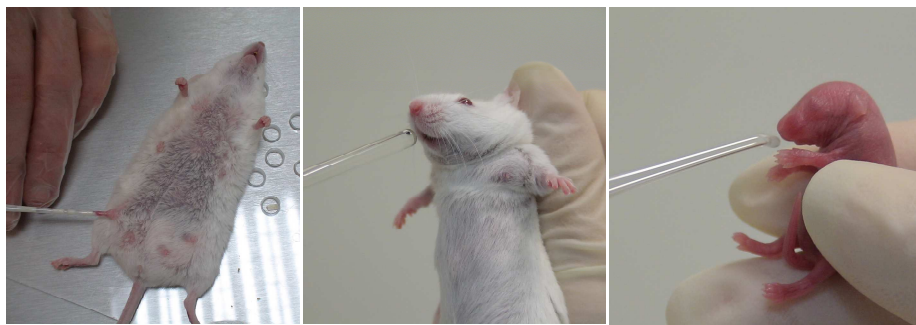


Figure 11. Collection of murine milk (left), maternal saliva (middle) and infantile saliva (right).

Procedure and Behavioral Variables

All behavioral testing of the newborn pups was run in a room adjacent to the breeding room to avoid interference with unwanted odors from conspecifics. Pups were separated from their mother 4 hr before testing to deprive them of suckling and maximize their responsiveness. During that pretest mother–pup separation, the male was kept with the litter, and the cage was put on a heating plate (temperature fixed at 40°C) to limit potential effects of social stress and hypothermia. The cutaneous temperature of the pups was then maintained between 36.0 and 36.7°C (as measured with an infrared camera: FlirTM A320, Flir Systems, Danderyd, Sweden), as in the nursing context.

A 2-min test (adapted from Dollinger et al., 1978; Pedersen & Blass, 1982; Todrank et al., 2005) was used to assess the pups' oral grasping of a nipple. First, the stimulus-females were sedated (Imalgène 1000 and Rompun 2%, at the dose of 45 and 9 mg/kg body weight, respectively) and hand-held by an experimenter A by pinching their inter-scapular skin to present the abdomen vertically (**Figure 12**). To expose the target nipple, the fur immediately surrounding it was moved aside with a cotton-tip. In Experiment 2, the nipples were treated

with one of the stimuli substrates. The tip of a glass stick was covered/dried with the substrates (*viz.*, amniotic fluid, milk, LF urine, and water as control) or into the donor animals' mouth (*viz.*, salivas). The substrates were then transferred onto one of the four inguinal nipples of a NLF by a rotating rubbing movement of the glass stick for 10 s (one rotation/s). Secondly, in both experiments, the tested pups were held by an experimenter B by pinching the inter-scapular skin between the thumb and forefinger. The 2-min test began to be timed when the pup was placed with its snout in slight touch with the target nipple of stimulus-female. During the test itself, experimenters indicated aloud the occurrence of start and end of nipple grasping, as well as the pace of mouth movements during grasping. The tests were also videotaped to subsequently code nipple grasping (latency to first occurrence and duration) and the frequency of mouth movements during grasping. The coder could therefore rely on the visible events on the videotape, as well as on the auditory "marks" that were recorded live. An oral response was noted as grasping when the pup stretched its mouth open when approached from a nipple and closed its lips around the nipple to subsequently act on it with sucking-like movements. The percentage of pups grasping the nipple and the latency of the first oral grasp response were used to compare groups of pups in terms of attraction and motivation for ingestive activity. The number of iterative mouth movements per seconds while grasping a nipple were considered as sucking behavior and were counted as a further index of the "avidity" of the pups' oral responses (akin to the latching/sucking response in neonates of other species; e.g., Doucet et al., 2007). When a pup failed to display oral grasping during a test, it was assigned a latency of 120 s.

Only the 4 inguinal nipples of a stimulus female were presented to pups, thus one female was used to test 4 pups. After the tests, the pups were returned with their littermates and parents into the breeding room, while the sedated/anesthetized stimulus/donor-females were gently laid down in an individual cage placed on a heating plate to be observed until fully awake.



Figure 12. One-day-old pup exposed to an unfamiliar female's nipple.

Statistical Analyses

A test of coding reliability was conducted on 10% of the videotapes (50/506), randomly selected, by a second coder who was blind to the nature of the stimuli under test. This test showed high reliability between the two coders on the presence/absence of pups' grasping behavior (100% of agreement), the latency of first grasping (Pearson's correlation, $r = .99$) and the number of mouth movement per seconds during grasping ($r = .99$).

Shapiro–Wilk tests indicated non-normal distribution of the variables in most groups, justifying the use of nonparametric statistics. In Experiment 1, we compared: (a) the percentage of pups grasping a nipple of LF and NLF with Fisher's exact tests, and (b) the latencies to orally grasp a nipple of LF and NLF, and the frequency of mouth movements (number/s) when orally grasping a nipple of LF and NLF with Mann–Whitney tests (Statistica, Version 8, Statsoft France, Paris). In Experiment 2, we compared the oral grasping performance when pups were exposed to a test condition (NLF nipple treated with one of the odor substrates) as opposed to either the control condition (NLF nipple treated with water) or the reference condition (intact LF nipple) using Fisher's exact tests (% oral grasping) and Mann–Whitney tests (latencies to the nipple grasping and frequency of mouth movements during nipple grasping).

RESULTS

Experiment 1: Nipple Grasping Responses on Females Contrasted in Physiological State

In all groups, the nipple odor of LF induced grasping responses more frequently, with shorter latency (P0: $U = 37$; P0+: $U = 28.5$; P1: $U = 44$, in all cases, $p < .001$) and with more frequent mouthing movements (P0: $U = 65$; P0+: $U = 60.5$; P1: $U = 46$, in all cases, $p < .001$) than the nipple odor of NLF (**Figure 13**). Thus, nipples of LF were clearly more potent at triggering oral grasping than the nipples of NLF.

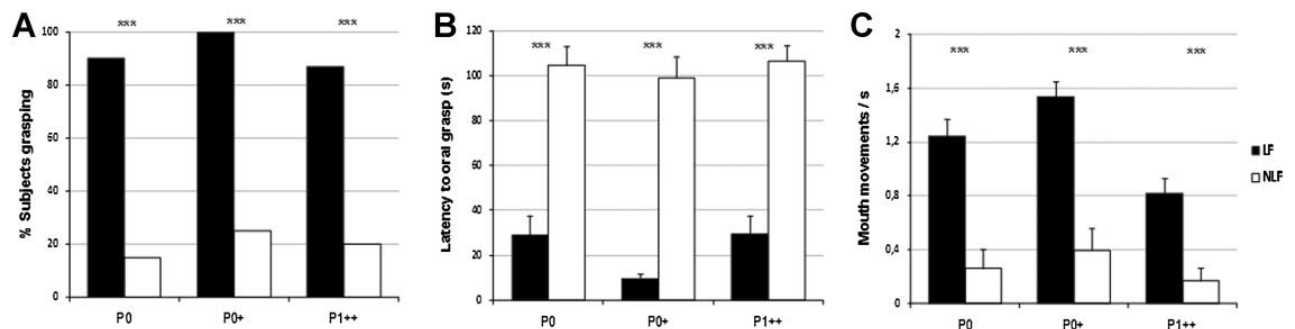


Figure 13. Oral grasping responses of newborn mice at birth, before and after the first suckling experience (groups P0 and P0+), and on day 1 (group P1) of a nipple from unfamiliar females at two different physiological states: lactating (LF) and non-lactating (NLF). (A) Percentage of pups orally grasping the nipple (Fisher's exact test, *** $p < .001$). (B) Mean latency ($\pm$ SEM) to the first nipple grasping. (C) Mean number ($\pm$ SEM) of mouth movements per second during nipple grasping (Mann-Whitney test, *** $p < .001$).

Experiment 2: Odor Substrates Involved in Nipple Grasping

The results from Experiment 1 indicate that nipples of LF were much more effective than nipples of NLF to induce oral grasping responses in the pups of the three experimental groups considered. Therefore, nipples of NLF might be taken as a valid baseline to compare the efficacy of various odor treatments on neonatal oral grasping performance. The present experiment aimed to identify which odor substrates supposed to be on the nipples of LF (viz., amniotic fluid, milk, LF saliva, pup saliva, and LF urine) are effective at eliciting the grasping response of pups when painted on the nipple of a NLF. Again, the 3 experimental groups (P0, P0+, and P1) were tested to evaluate the influence of suckling experience/learning on initial oral grasping responses (results are presented in **Figure 14**).

Suckling-Inexperienced Newborns. Prior any suckling experience (group P0), amniotic fluid and milk odors trigger oral grasping responses of a NLF nipple more frequently ($p = .025$; $p =$

.019; respectively) and with shorter latencies ($U = 146$, $p = .009$; $U = 119.5$, $p = .011$; respectively) than water. Moreover, once it has been orally grasped, a NLF nipple painted with milk elicits more frequent oral movements than a NLF nipple painted with water ($U = 131.5$, $p = .030$).

However, as compared with the reference stimulus (LF nipple), a NLF nipple treated with either amniotic fluid, murine milk, LF saliva, pup saliva, or LF urine elicits less frequent ($p = .008$; $p = .031$; $p = .001$; $p = .001$; $p < .001$; respectively) and slower ($U = 135$, $p = .012$; $U = 74.5$, $p = .001$; $U = 57$, $p < .001$; $U = 47.5$, $p < .001$; $U = 23$, $p < .001$) oral grasping responses by the pups. In addition, they exhibit less frequent sucking-like oral activity on a NLF nipple painted with either amniotic fluid ($U = 133.5$, $p = .011$), LF saliva ($U = 118$, $p = .003$), pup saliva ($U = 88$, $p = .002$) or LF urine ($U = 28$, $p < .001$) than on a LF nipple.

In sum, amniotic fluid and milk odors appear to significantly release oral grasping in newborn mice tested prior to any suckling experience. However, the odor blend naturally emitted from the LF nipple appears significantly more efficient to elicit oral grasping than both of these substrates painted separately on a NLF nipple.

Newborns After One Suckling Experience. For the 5-to 8-hr-old pups with only brief suckling experience (group P0+), amniotic fluid, milk, or LF saliva odors elicit more frequent oral grasping ($p = .023$; $p = .001$; $p = .015$; respectively), with lower latency ($U = 122.5$, $p = .020$; $U = 101$, $p = .004$; $U = 165.5$, $p = .049$) and more frequent oral actions ($U = 125$, $p = .022$; $U = 75$, $p = .001$; $U = 140$, $p = .008$; respectively), on a NLF nipple than the control stimulus (water).

However, the odors of amniotic fluid, milk, LF and pup salivas or LF urine trigger oral grasping responses of a NLF nipple less frequently ($p = .001$; $p = .021$; $p = .001$; $p < .001$; $p < .001$; respectively) and with higher latencies ($U = 62.5$, $p = .001$; $U = 82$, $p = .001$; $U = 51.5$, $p < .001$; $U = 71.5$, $p = .001$; $U = 4$, $p < .001$) than the odor emitted by a LF nipple. Moreover, after grasping a NLF nipple, the pups display less oral activity on it when it is painted with amniotic fluid, pup saliva or LF urine than to an intact LF nipple ($U = 112$, $p = .010$; $U = 112$, $p = .006$; $U = 35$, $p < .001$; respectively).

In sum, amniotic fluid, milk, and LF saliva odors appear to significantly release oral grasping of a NLF nipple in newborn mice who have had suckling experience, although in a very

limited amount. Nevertheless, these odor substrates remain significantly less efficient at activating oral actions than an intact LF nipple.

Suckling-Experienced Newborns. For 24- to 36-h-old pups with more substantial suckling experience (group P1), the odors of amniotic fluid, milk, LF, or pup salivas trigger more frequent oral grasping responses of a NLF nipple than the water stimulus ($p = .025$, $p = .004$, $p < .001$, $p = .035$; respectively). Moreover, milk and LF saliva odors elicit grasping with lower latency ($U = 113$, $p = .010$; $U = 92$, $p = .002$; respectively) and with more oral activation ($U = 107$, $p = .006$; $U = 99$, $p = .003$; respectively) than water. Finally, the oral grasping of a NLF nipple is slower to appear when painted with LF urine ($U = 160$, $p = .038$) and less sucking-like mouth movements are then expressed ($U = 160$, $p = .038$) as compared with a NLF nipple painted with water.

However, amniotic fluid, pup salivas, and LF urine odors elicit less frequent ($p = .042$, $p = .015$, $p < .001$; respectively) and less rapid ($U = 127$, $p = .007$; $U = 192$, $p = .012$; $U = 30$, $p < .001$; respectively) oral grasping responses than the odor of an intact LF nipple. In addition, the odor of a LF nipple causes more oral activation than LF urine odor ($U = 30$, $p < .001$), but less active mouthing response than milk and LF saliva odors ($U = 97$, $p = .025$; $U = 63$, $p = .001$; respectively).

In sum, for newborn mice having accumulated more extensive sucking experience, all LF nipple-related odor substrates, except LF urine, appeared to significantly release oral grasping and sucking movements. Thus, at this stage of development, all substrates presumed to be present on a LF nipple are separately effective in rendering a NLF nipple attractive. Moreover, when a NLF nipple was spread with murine milk and LF saliva, it elicited a level of oral grasping that was similar to that elicited by an olfactorily-intact LF nipple.

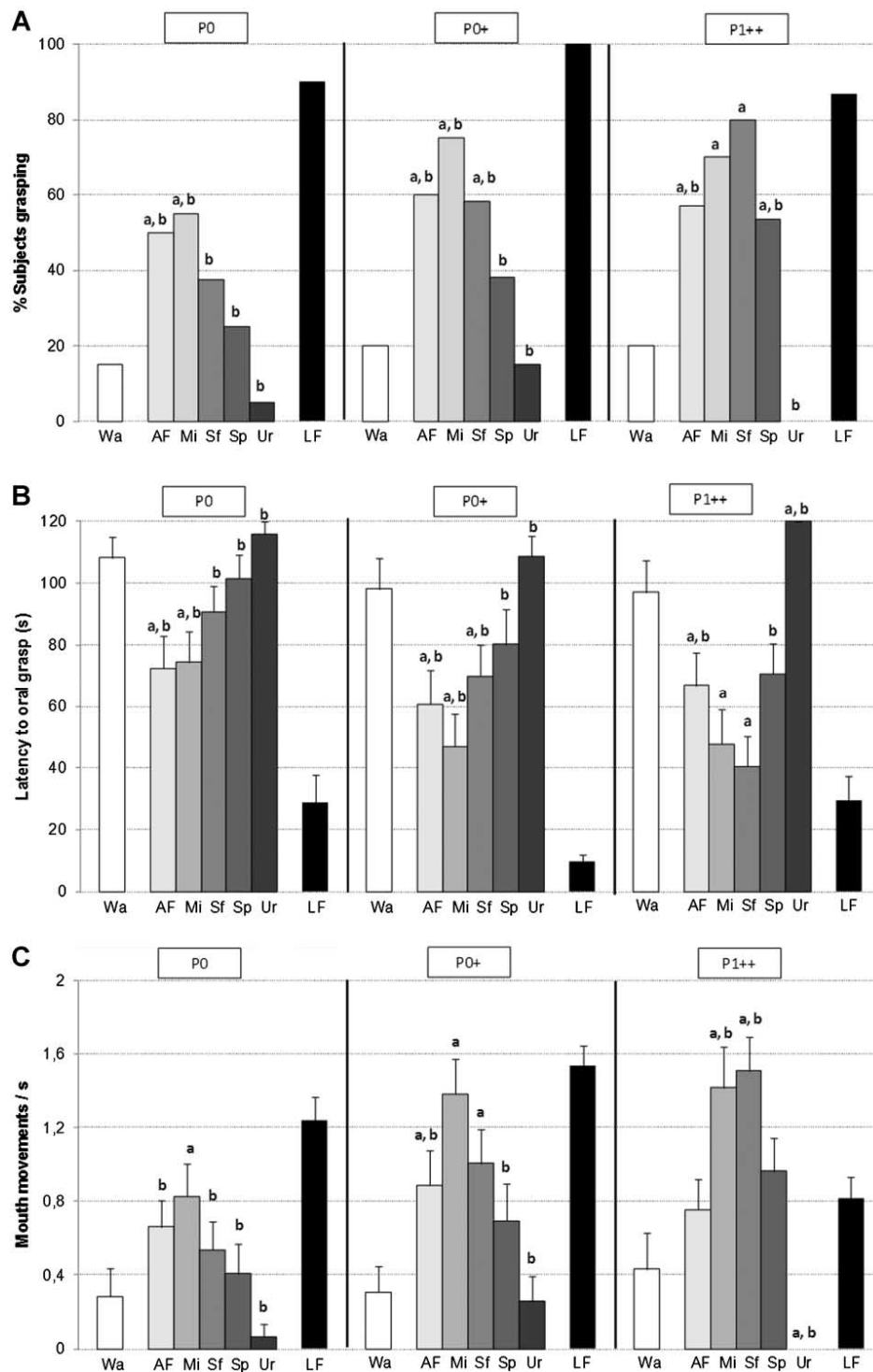


Figure 14. Oral grasping responses of newborn mice at birth, before and after the first suckling experience (groups P0 and P0+), and on day 1 (group P1) of a nipple from a non-lactating female (NLF) painted with different odor substrates [viz. water (Wa), amniotic fluid (AF), milk (Mi), LF saliva (Sf), pup saliva (Sp), and LF urine (Ur)]. (A) Percentage of pups orally grasping the nipple (Fisher's exact test). (B) Mean latency ($\pm$ SEM) to the first nipple grasping (s). (C) Mean number ($\pm$ SEM) of mouth movements per second during nipple grasping (Mann-Whitney test). Statistical significant differences ($p < .05$) between biological substrates and water (white bar) or intact LF nipple (black bar) were indicated respectively with "a" and "b".

DISCUSSION

The present study aimed at identifying odor substrates that induce oral grasping of nipples in newborn mice before and after having experienced for the first time sucking and the ingestion of colostrum/milk. Experiment 1 verified whether newly born pups do chemosensorily differentiate nipples from a LF and from a NLF. Results indicate that pups seized more efficiently and more rapidly the former than the latter stimulus. Therefore, nipples of NLF were taken in Experiment 2 as ecologically valid neutral context to develop a behavioral assay of odor stimuli for the newborn mouse. Accordingly, any stimulus mimicking the high level of response elicited by the LF might be considered of high significance to pups, whereas stimuli eliciting low response levels of response (as the NLF) might be considered of low significance.

In Experiment 2, we took advantage of this assay to screen a set of chemostimuli that are presumed to naturally coat the nipples of LF because of relevant maternal/infantile physiology and behavior. This assay proved to be discriminative. On average, differential responses were evidenced toward NLF nipples painted separately with amniotic fluid, milk, LF saliva, pup saliva, and LF urine. This behavioral assay was also capable of revealing the effects of age and confounded experiential effects on the ability of mouse pups to rely on various odorants as cues to promote searching, oral seizing, and sucking of a nipple.

Three aspects of these results will be discussed: the olfactory salience of LF nipples in mouse pups with or without suckling experience; the nature of the odor substrates and hypothetical mechanisms involved in the initial oral grasping by sucking-naïve mouse pups; and the nature of odor substrates and mechanisms that more readily elicit nipple grasping in sucking-experienced pups.

The Salience of Nipples of Lactating Females

The nipples of LF elicited about 4 times more oral grasping responses in newborn mice than those of NLF. The active searching and avid oral grasping of LF nipples by pups have been reported in previous studies in mice (see section II.1; Hongo et al., 2000; Kodama, 1990; Todrank et al., 2005). What makes LF nipples unique to newly born pups? In postparturient LF, the nipples concentrate mammary and extra-mammary odor substrates which may qualitatively and/or quantitatively differ from remaining abdominal odor pattern, explaining the efficient localization and oral seizing performance by the pups (Schaal, 2010). In the

mouse, the nipples of LF secrete at least two odorivector substrates, colostrum/milk and sebum. The possibility should be considered that some traces of milk ooze from the ostia at the tip of the LF nipples, and elicit more mouthing activity in the pups than the NLF nipples, even painted with attractive odor substrates. If this possibility cannot be completely dismissed, it does not explain why LF nipples induced the same level of mouthing than the NLF nipples painted with either milk (in sucking-inexperienced and -experienced pups), maternal saliva (in sucking-experienced pups), amniotic fluid, and pup saliva (in sucking-experienced pups). Moreover, the odor of the LF nipple elicited a less active mouthing response than milk and LF saliva odors painted on the NLF nipple (in sucking-experienced pups).

While milk production is obvious, sebum secretion is suggested indirectly by the increased number and size of sebaceous glands (Koizumi et al., 2003). In addition, extra-mammary odor substrates are laid down locally through the females' increased self-licking of the nipple-lines (in mice: Harvey & Mann, 1987) and by the pups' themselves through their searching and sucking activities. Thus, physiological and behavioral changes of LF and neonate pups may have the effect of locally increasing the emission and mingling of a variety of substrates bearing semiochemical significance by themselves, including amniotic fluid, nipple skin gland secretions, colostrum/milk, maternal and infantile saliva, infant's saliva-milk coagulate, mother's and infant's facial glands' secretion (i.e., lachrymal glands: Shahan et al., 1987; Meibomian glands: Nien et al., 2009), infant pedal glands (e.g., Nejsun et al., 2005; Stevens & Landis, 1987; Vilches et al., 2002), maternal and infants' secretions from ano-genital glands, and traces of urinary/fecal excretions. Several of these substrates were directly assayed here. In addition, these secretions may interact through their contents in enzymes or other bioactive compounds to facilitate the release of volatiles (see below).

Substrates Involved in the Initial Expression of Oral Grasping of Sucking-Naïve Pups

Experiment 2 explored some substrates potentially involved in the very first nipple grasping of sucking-inexperienced mouse pups (group P0). In the present conditions, pups "elected" amniotic fluid and conspecific milk as the most efficient odor substrates (as compared to the control) to release their initial nipple grasping and sucking responses. At this early stage, maternal saliva, pup saliva and maternal urine did not appear to carry odor cues significant enough to induce the oral grasping of a nipple.

This initial response in favor of amniotic fluid odor is consistent with previous data in mice where PND-2 mouse pups preferred grasping nipples coated with amniotic fluid than with saline or a novel odorant (vanilla) (Kodama, 1990). Much in the same way as neonatal mice, newborn rats were also strongly attracted to the amniotic fluid odor presented in the context of a nipple from the very first exposure (Arias & Chotro, 2007; Blass & Teicher, 1980; Korthank & Robinson, 1998; Teicher & Blass, 1977). But even more, PND-1 rat pups can be set into sustained crawling motion by amniotic fluid odor, but not by a novel artificial odorant (Mendez-Gallardo & Robinson, 2011). Amniotic fluid odor appears thus to have immediate reinforcing value in the newly born pup and may tend to elicit oral activation.

Prenatal chemosensory experience with amniotic fluid might assist mouse pups to prompt postnatal actions in direction of objects/areas which are imbued with it. Much evidence for that claim has been obtained in the rat. Rat newborns are indeed attracted to the odor of amniotic fluid that favors navigation over the mother's abdominal fur to locate nipples, and promotes the initial sucking episode (Hofer et al., 1976; Teicher & Blass, 1977; Ronca & Alberts, 1994; reviewed in Blass, 1990; Alberts & Ronca, 2012). The efficiency of this fetal odor substrate to rapidly initiate neonatal oral grasping could be explained by processes of familiarization and/or conditioning established *in utero*. First, amniotic fluid sensation contingent with oral activity in the very last days of gestation induces endogenous opioid activation in the fetal rat (Robinson & Mendez-Gallardo, 2010), probably leading to associate proprioception of oral action with odorivector amniotic compounds. Second, the chemosensory properties of amniotic fluid acquired as familiar *in utero* may lead to the formation of a "search image" that the neonatal pup will trace in the multisensory novelty of the postnatal environment. Finally, amniotic odor cues might result from reinforcing events occurring intrapartum or the very first interactions with the dam, such as waves of body compression during labor, warmth/comfort of the mother's ventrum, maternal licking or gastric filling after the first suckling (Alberts & Ronca, 2012; Ronca & Alberts, 1994, 1995; Miller & Spear, 2009).

The attractive potency of murine milk odor was already known in mouse newborns aged 5–6 days and thus having had extensive exposure to milk (section II.1). Here, we corroborate this effect of milk odor with pups before they had any opportunity to suck. To our knowledge, rat newborns have been tested only once for their response to conspecific milk odor, but without successful demonstration that it affects oral grasping of a nipple (Singh & Hofer, 1978; see also Small, 1899, for an earlier attempt). Two perceptual mechanisms might explain the

equivalent efficacy of amniotic fluid and milk odors to elicit the first suckling in mouse newborns. First, amniotic and lacteal fluids may be compositionally overlapping so that chemosensory cues derived by the fetus from its amniotic environment can be traced in milk by the newly born pup. This process of transnatal chemosensory continuity relies on the fetal encoding of a chemosensory image and on neonatal use of it to orient postnatally (Alberts & Ronca, 2012; Coureaud et al., 2002; Pedersen & Blass, 1982; Schaal, 2005; Schaal & Orgeur, 1992). Second, milk might be immediately attractive through its content in compounds that are unconditionally appetitive from birth onward. Such a predisposed process has been documented in the newborn rabbit where one single odorant (2MB2) released in the mammary tract (Moncomble et al., 2005) fully explains the attractiveness of entire milk (Schaal et al., 2003; Schaal et al., 2008a; Coureaud et al., 2010).

Nevertheless, when presented in isolation on a “neutral” nipple (of a NLF), amniotic fluid and milk appeared much less effective in releasing oral grasping responses in P0 pups than the whole-odor of a LF nipple. The behavior activation by amniotic fluid and milk being about half that of a LF nipple, each of these odor substrates presumed to be spread on the nipple, and studied separately, does not fully explain the high level performance of pups facing a nipple of a LF. This finding might be understood in several ways. First, splitting a complex odor mixture into fractions is otherwise known to reduce its original behavioral activity (e.g., Müller-Schwarze, 2006; Müller-Schwarze & Houlihan, 1991). The different fractions in a biological mixture may indeed interact and potentiate each other. For example, several low-intensity, below-threshold odorants may interact to produce a discernible percept (e.g., Laska et al., 1990). In addition, the biological activity of one substrate may affect the release of volatiles in a co-occurring substrate; for example, enzymatic activity in saliva is known to speed up the liberation of volatiles from complex food mixtures (Büttner, 2002). Thus, future experiments should consider evaluating the behavioral activity of odor cues resulting from the mixing of different biological substrates (e.g., amniotic fluid and/or milk mixed with maternal and/or pup salivas). Second, in selecting the most obvious substrates that derive from local biologically sources or from deposits deduced by observing the behavior of a nursing mother and sucking pups, we may have escaped less obvious (and more difficult to collect) sources of active compounds, such as sebum from the mammary papillae or secretions from other glands present in the neonatal labial or facial regions (see above). Third, it may be possible that the ketamine/xylazine used for anesthesia modify the odor/flavor properties of amniotic fluid and milk, as they are potentially transferred into the fetal or mammary compartments (Putter &

Sagner, 1973; Sellers et al., 2010). However, this effect appears limited as amniotic fluid and milk odors were the most efficient odor substrates to release initial nipple grasping/sucking responses in sucking-naïve pups. Moreover, milk applied on a NLF nipple induced as much oral grasping/sucking as the LF nipple in 24- to 36-hr-old sucking-experienced pups.

But, regardless of the causal hypotheses for the immediate attraction of amniotic fluid and milk, the processes mentioned above do apparently not apply in sucking-inexperienced pups for the saliva of LF and of other neonates. Even if pups may have been shortly in contact with LF saliva and pup saliva prior to suckling due to their own salivary production and licking by the mother (Gabe, 1956; Weber & Olsson, 2008), both LF and pup salivas do not significantly affect nipple grasping in suckling-naïve mice. This finding is at variance with the responses noted in neonatal rats. Newly born rat pups exhibit robust oral grasping responses toward washed nipples of a LF rat after it has been painted with the saliva of a LF or of a same-age pup (Blass & Teicher, 1980; Teicher & Blass, 1976; 1977; Pedersen & Blass, 1981). Finally, the lack of any significant behavioral effect of the urine odor of LF in the present study echoes previous data in sucking-inexperienced neonatal rats (Teicher & Blass, 1977).

It may be summarized that amniotic and lacteal fluids carry odor compounds which contribute to induce suckling-inexperienced newly born pups to grasp and suckle a behaviorally neutral nipple. In contrast, the saliva from either a LF or an age-mate, as well as urine from a LF, appeared insufficient to influence oral responses in naïve pups. In any case, the behavioral effect of the whole odor developing on the nipple of a LF is not equaled by any of the components considered here; suggesting that the behavioral activity of the odor mixture that is naturally present on the nipple exceeds those of various substrates that presumably contribute to it.

Substrates Involved in the Expression of Oral Grasping in Suckling-Experienced Pups

With cumulative suckling experience, most of the stimuli considered here became increasingly efficient at eliciting the nipple grasping response in mouse pups. Pups that had only brief suckling experience (P0+ group) orally grasped nipples painted with amniotic fluid, milk and LF saliva, but remained non-responsive to nipples painted with pup saliva and LF urine. With more extensive suckling experience (P1 group), amniotic fluid, milk, LF saliva and pup saliva became equivalently effective in releasing nipple grasping. However, despite the fact that traces of urine may be presumed to be spread on nipples through the maternal licking of their own and their pups' ano-genital areas, this substrate remained inefficient to

elicit nipple grasping at any of the early ages considered. In addition to the processes of fetal or perinatal acquisition of amniotic odor cues mentioned above, the increasing variety of odor cues capable of eliciting oral grasping of a nipple by mouse pups may be interpreted in terms of associative learning during the first nursing episodes. Several processes may be outlined.

First, nipples may be considered as “olfactory hotspots” where locally emitted and “imported” odor substrates do mingle. The amniotic traces left there by maternal self-licking are mixed with colostrum/milk and saliva deposits. In this way, maternal saliva odor gradually may get equivalent reinforcing value as amniotic fluid and milk. Later on, in the P1 group of pups exposed to a bit more nursing experience, infantile saliva odor may also join the set of substrates becoming nipple-grasping elicitors. Functionally similar associative learning during suckling/milk ingestion or maternal care has been abundantly documented in rodent newborns with artificial odorants (mouse: Armstrong et al., 2006; Bouslama et al., 2005; Durand et al., 2003; rat: Brake, 1981; Cheslock et al., 2000; Johanson & Hall, 1979; Johanson & Teicher, 1980; Pedersen et al., 1982; Sullivan et al., 1986b).

Secondly, in the early age considered here (PND 0–1), the whole odor of LF nipples remains more active than its presumable components tested separately. A previous study suggested that more nursing-related olfactory experience than 1 day may be necessary to equate the odor of a LF nipple with its component odors: that is, by the end of the 1st postnatal week, pups become equivalently attracted to the whole odor of a LF nipple than to the separate odor substrates presumed to be present on it (i.e., milk, LF saliva, and pup saliva) (see section II.1). Thus, several days of repeated exposure to all these odor substrates in highly rewarding conditions may likewise be needed to establish multiple cues bearing similar behavioral activity toward nipple grasping.

Thirdly, it is notable that all odor cues that are presumed to be contingent with a LF become efficient to release attraction in mouse pups. The case of urine of LF which does not exert any control over nipple grasping or sucking over the early period considered is interesting. In contrast, urine appears to bear a negative value in P1 pups, as its potency to elicit nipple grasping is weaker than that of the control stimulus. Thus, either odor cues associated with urine are not detected by newly born pups, or we may have overstated deposition of urine deduced from the observed dams’ self-licking from her or her pups’ uro-genital areas to her abdominal fur. Alternatively, urine traces on nipples may be maladaptive at such early age in that they may misdirect searching motions toward the nipples. Although it is obviously

present as a contextual cue in the nest boxes, urine odor may become more engaged in the modulation of murine social relationships in later development, during sexual maturation and when partner selection becomes effective (e.g., Keller et al., 2008; Moncho-Bogani et al., 2002; Roberts et al., 2010). Thus, for an odor to become an attractive cue to mouse pups in the context of suckling, it should be associated with the body area that the dam normally exposes while suckling, and not with an area that has no relevance with sucking success. In that sense, mouse pups do indeed approach the odor of the abdomen of a LF more than the odor of the back of a LF (see section II.1).

In conclusion, the present study found that, among various odor cues presumably coating the nipples of LF mice, only amniotic fluid and milk released nipple grasping in newly born, suckling-inexperienced pups. This suggests firstly that some cues may be established immediately or very early after birth, either through previous (fetal) learning or through unconditional perceptual processes. Secondly, with increasing suckling experience, the cuing and releasing value of the substrates changes progressively, some gaining additional strength (milk and LF saliva) and some gaining new meaning (LF and pup salivas). These findings indicate that the behavioral activity of maternal and pup salivas clearly depend on postnatal learning. All these processes can work separately or inclusively, so that amniotic fluid and milk can be attractive/appetitive due to the same (e.g., fetal odor learning) or multiple causes (e.g., fetal learning, neonatal learning, unconditional predisposition). Nevertheless, behavioral activity of each substrate appears to be quite moderate with regard to the whole odor mixture given off by the nipples of LF, in particular for inexperienced-sucking mice.

Upcoming work will have to evaluate neonatal responses to the secretions of skin glands present on the nipples of LF. Future studies should also introduce relative preference testing among the different odors substrates emitted from, or associated with, the nipples of LF, so that potential differences in volatility, intensity, or quality between the distinct fractions are directly assessed by the newborn pups. Another issue of interest will be to understand whether the behavioral activity of the LF nipple odor for sucking-naïve pups is carried in separate component substrates or whether it is a result of components interacting in the natural mixture. Understanding such processes may ultimately help to identify chemical compounds that are involved in the initial nipple-tracking of newly born mice, and decipher the behavioral and neural mechanisms underlying the perceptual abilities of a newborn in face of stimuli that are critical for survival.

2.3) Conclusion

Dans cette étude, nous avons examiné la nature des substrats olfactifs qui induisent la saisie orale chez le souriceau. Seules les tétines de femelle allaitante (FA) déclenchent la saisie orale chez des souriceaux pas ou peu expérimentés à la tétée. Ceci nous a conduit à utiliser les tétines de femelle non allaitante (FNA) comme support « neutre » pour tester la capacité de 3 substrats olfactifs (le lait, la salive maternelle et la salive infantile), potentiellement présents sur la tétine des FA, à induire la saisie d'une tétine de FNA.

Les résultats ont révélé que : 1) les odeurs de liquide amniotique et de colostrum ont le pouvoir de déclencher la première tentative de saisie d'une tétine maternelle chez le souriceau inexpérimenté ; 2) l'odeur de salive de FA n'a commencé à induire la saisie orale qu'après la première expérience de tétée ; 3) l'odeur de salive infantile ne déclenche la saisie orale qu'après 24–36 h d'expérience de tétée ; enfin 4) l'odeur d'urine de FA et de l'eau sont sans effet sur le comportement de tétée. Ces résultats suggèrent ainsi qu'une réponse prédisposée ou une familiarisation à certains composants odorants du lait et du liquide amniotique durant la phase prénatale du nouveau-né pourraient expliquer l'implication précoce de ces deux substrats dans la tétée du nouveau-né murin. Par ailleurs, un apprentissage associatif positif semble nécessaire pour engager les substrats salivaires dans la saisie de la tétine.

En résumé, ces deux premières études mettent en lumière que les souriceaux nouveau-nés ont la capacité d'apprendre et d'utiliser des indices sensoriels expérimentés dans le milieu prénatal et postnatal. La tétée est un contexte multidimensionnel, extrêmement renforçant et donc propice aux apprentissages olfactifs dès la ou les toute(s) première(s) tétée(s) chez le souriceau. En effet, des stimuli variés associés au contexte de tétée ont été identifiés comme étant des Stimulus Inconditionnel (SI), comme par exemple la stimulation tactile (souris: Bouslama et al., 2005; rat: McLean et al., 1993; Pedersen et al., 1982), l'ingestion de lait (rat: Johanson & Teicher, 1980; Sullivan & Hall, 1988), l'odeur de la salive maternelle (rat : Sullivan et al., 1986b), la succion non-nutritive (rat : Brake, 1981) et la chaleur (rat : Pedersen et al., 1982). Si tous ces SI permettent séparément le conditionnement olfactif chez le nouveau-né, leur action conjointe lors de la tétée naturelle à toutes les chances de constituer une situation robuste d'engagement des apprentissages néonataux.

Des expériences complémentaires ont été réalisées et sont décrites dans l'Annexe 2.

3) APPRENTISSAGES OLFACTIFS ASSOCIES AU CONTEXTE DE TETEE CHEZ LE SOURICEAU

3.1) Introduction

Dans les deux études précédentes, nous avons identifié des substrats olfactifs, présents sur la tétine de femelle allaitante, impliqués dans sa localisation et dans l'induction du comportement de tétée chez le souriceau. Il en ressort que l'odeur du lait est particulièrement réactogène et en mesure de déclencher la première tétée du nouveau-né, tandis que les salives maternelle et infantile ont un effet plus tardif. Cependant, les mécanismes cognitifs mis en jeu dans l'émergence de cette attractivité précoce restent hypothétiques et peuvent impliquer l'acquisition prénatale ou postnatale, ou encore une réponse prédisposée, c'est-à-dire, sans nécessité d'apprentissage préalable. Il n'est pas à exclure que l'expression initiale de la recherche et de la succion pourrait assigner une valeur positive au lait, ou encore que le lait pourrait transférer son pouvoir attractif à d'autres odeurs présentes sur la tétine, comme par exemple, la salive.

A ce jour, les apprentissages olfactifs dans le contexte de la tétée ont été peu étudiés chez le souriceau. La tétée, ainsi que diverses stimulations (par exemple, tactile, thermique et olfactives) associées au contexte de tétée, ont été identifiés comme étant des Stimuli Inconditionnels (SI) capables de conditionner les préférences olfactives des souriceaux (Armstrong et al., 2006 ; Bouslama et al., 2005; Bollen et al., 2012). Cependant, il reste encore à définir si la tétée elle-même peut renforcer les apprentissages olfactifs et conférer à une odeur neutre le **pouvoir d'induire la saisie orale d'une tétine**.

Notre troisième expérience a pour objectif d'affiner nos connaissances sur l'acquisition et la rétention des apprentissages olfactifs dans le contexte renforçant de la tétée chez des souriceaux âgés de 24 heures. Les objectifs de cette étude sont multiples. Tout d'abord, nous fondant sur le fait que les salives n'acquiescent leur activité comportementale qu'après la première tétée, nous souhaitons comprendre dans quelle mesure un odorant neutre peut acquiescent, après une ou plusieurs association(s) avec la tétée, le pouvoir d'induire la saisie d'une tétine de femelle dont l'abdomen en a été odorisé. A cette fin, les souriceaux seront exposés à un odorant (le limonène) dans les mêmes conditions que celles notées pour les salives : le contexte renforçateur de la tétée au cours de 24 h. Ensuite, afin d'affiner nos méthodes, nous explorerons la rétention de cet apprentissage et la durée d'association entre le limonène et la tétée nécessaires à cet apprentissage.

3.2) An exploratory study of nursing-related odor learning in mouse pups on the 1st postnatal day⁴

Syrina Al Aïn, Mathieu Mingioni, Bruno Patris, Benoist Schaal

INTRODUCTION

Localize and suckle a maternal nipple are the main skills that mammalian newborns have to acquire at birth. Although the mother provides most of the pups' needs in term of protection, thermoregulation and nutrition, their survival depends of their own ability to locate and attach to the nipples, suckle and convert the milk in to biomass. In this context, learning is especially crucial to boost new acquisition and ameliorate motor actions. The developing organism has to adapt itself to a succession of early ingestive niches including: the womb where nutrients and energy are passively perfused, the early postnatal niche requiring the sucking of nipples, and the transition to the processing of increasing amounts of a non-milk diet. These successive ingestive niches are dramatically contrasted, pup being enforced to adaptively adjust on anatomical, physiological, sensory and behavioral levels. Numerous studies have revealed the role of experience-sensitive processes in the pups' adaptation within and between these ingestive niches (Albert, 1987; Schaal, 2010).

Altricial rodents are born with non functional visual and auditory systems, and are thus exclusively guided by somesthesia and chemoreception (Ehret, 1976; Weber & Olsson, 2008). The newborn pup survival thus relies greatly on its ability to respond to olfactory cues associated with the mother, her nipples and milk. Indeed, transgenic mice with anosmic or hyposmic phenotypes will often die of starvation (Baker et al., 1999; Brunet et al., 1996; Hongo et al., 2000; Lin et al., 2004; Wong et al., 2000), as well as denaturing the odor of nipples will disturb grasping in normal pups (Hongo et al., 2000).

Specifically, the first oral grasping of a nipple in rats and mice is elicited by amniotic and colostrum odors. The amniotic odor is thought to be acquired by *in utero* exposure through the prenatally functional olfactory system (Coppola & O'Connell, 1989; Coppola & Millar, 1997), with the possibility of further reinforcement by sucking nipples tainted with amniotic

⁴ Article en préparation

cues by mother's self-licking (Weber & Olson, 2008). Amniotic fluid shares also common odor cues with colostrum, which establishes a relative transnatal chemiosensory continuity (Mendez-Gallardo & Robinson, 2011; Schaal, 2005) and colostrum may thus be initially attractive to pups because it carries cues acquired *in utero* or during the birth processes (Alberts & Ronca, 2012). With age and increasing suckling experience, the associative value of other odorants present on the nipple can also change progressively. For example, the mother's and pup's saliva odors appear to need several associations with nursing before they can elicit nipple grasping in mouse pups.

So far, the ability to form such odor-based associations was mainly established in newborn **rats** (Wilson & Sullivan, 1994). Indeed, rat pups acquire a preference for a novel artificial odorant if it has previously been paired with nutritive or non-nutritive sucking (Brake, 1981). The rewarding unconditional stimuli that operate during suckling are numerous and varied, including tactile stimulation (McLean et al., 1993; Pedersen et al., 1982; tailpinch: Sullivan et al., 1986a; mild footshock: Camp & Rudy, 1988; Sullivan & Wilson, 1990; quoted in Wilson & Sullivan, 1994), olfactory stimulation (odor of maternal saliva: Sullivan et al., 1986b), nutritive ingestive stimulation (cow's milk or saccharine ingestion: Cheslock et al., 2000; Johanson & Hall, 1979, 1982; Johanson & Teicher, 1980; Sullivan & Hall, 1988), humidity (Do et al., 1988) and heat (Pedersen et al., 1982). All these unconditional stimuli allow to rapidly condition odor preferences or aversions in rat pups in function to the nature of the stimulus and the age of pups. A few studies have also explored similar conditioning of odorants in **mice**, with lithium chloride-based illness in 3 day-old pups (Alleva & Calamandrei, 1986), maternal deprivation in 2 day-old (Durand et al., 2003), tactile stimulation in P1 to P6 pups (Bouslama et al., 2005) or suckling experience in pups of 3, 6 and 10 days (Armstrong et al., 2006). These studies demonstrated robust conditioned odor preferences in neonatal mice in the context of nursing and maternal care (Armstrong et al., 2006; Bouslama et al., 2005; Durand et al., 2003) that can be retained lifelong (Mainardi et al., 1965). So far, the associative abilities of mice were not investigated in the hours following birth, when pups undergo their very initial reinforced actions in contingency with the mother, nipples and milk.

Here, we aimed to investigate associative and mnesic capabilities of neonatal mice within the first 24 hours ($\pm$ 12 hours). Our first goal was to assess whether a neutral odorant, previously associated with suckling could acquire the power to elicit oral grasping of a nipple (Experiment 1A). The second goal was to evaluate the pups' abilities to retain such an odor

previously associated with suckling (Experiment 1B). Our third goal was to approach the minimal duration necessary to condition odor-based oral grasping in one-day-old pups (Experiment 2). The final goal examined whether odor exposure, in absence of the mother and suckling could be sufficient to assign a reinforcing value to it (Experiment 3).

GENERAL METHODS

Animals and housing conditions

The French national and local rules about the use of laboratory mice were strictly followed (authorization n° 21 CAE 059). Pairs of female and male mice (*Mus musculus*, BALB/c strain, purchased at Charles River, L'Arbresle, France) were housed together in standard Plexiglas cages (28 x 17 x 13 cm) in the local breeding unit. Males were continuously kept in the cage to support their parental care and ensure fecundation at postpartum oestrus. The breeding room displayed constant temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and 12/12h light/dark cycle (lights on at 8h00). Water and food pellets (Scientific Animal Food & Engineering, Ionisos Aube, Champagne) were available *ad libitum*.

Test Animals

We tested 113 mice pups on postnatal day (P) 1 ($24 \text{ h} \pm 12 \text{ h-old}$), the day of birth being recorded as P0. The conditioning of arbitrary odorant was shown to require deprivation of the mother prior to training (Armstrong et al., 2006), the pups were isolated from their mother for 2 h before each training session. Each pup was tested in only one experimental condition. The tested pups came from litter comprising 4-8 pups. We tested a maximum of four pups per litter by group; thus, pups from a same litter could participate in different experiments.

Stimuli

Odor Stimuli

The odorant used for the conditioning was limonene ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Fluka), as in previous studies on odor learning in mouse pups (Armstrong et al., 2006; Bollen et al., 2007; Bouslama et al., 2005; Schellinck et al., 2001). The odorant was diluted at $6,06 \cdot 10^{-2} \text{M}$ (in water), a concentration at which the odorant is detected and non aversive for mice (Joshi et al., 2006) and rats (Youngentob et al., 1997). The odorant solution was prepared each week to avoid a potential alteration. The control stimulus consisted in water.

Stimulus animals

The conditioned odorant was delivered on the nipples of a non-lactating female (NLF), which were shown to be olfactorily inactive to pups to induce sucking behaviour. A tip of a glass stick was soaked with the stimulus (viz., limonene or water) and was then transferred onto each of the ten nipples of a NLF by a rotating rubbing movement of the glass stick for 5 s (one rotation/s). In total, 37 stimulus-females were used to test the pups, and 4 to 6 stimulus-females were used per test condition. The nipples of NLF were directly presented under the pups' muzzle.

General Training and Testing procedures

All behavioural training and testing of the newborn pups were run in a room adjacent to the breeding room to avoid interference with unwanted odours from conspecifics. The specific training procedures are described below, in the Methods section specific to the experiments.

Concerning the testing procedure, a 2-min test was performed to assess oral grasping of the nipples (adapted from Dollinger et al. 1978; Pedersen & Blass, 1982). The NLF used was sedated (Imalgène 1000 and Rompun 2%, at the dose of 45 and 9 mg/kg body weight, respectively) and held by pinching their inter-scapular skin by an Experimenter A. The pup was held similarly by an Experimenter B to be presented facing a nipple (see **Figure 12**, section II.2). At the start of each trial, pups were placed with their muzzle in slight contact with an inguinal nipple of the stimulus female.

The behaviour of each pup was then videotaped for 180 s (SONY handycam DCR-SR90). The videotapes were then blindly analysed (The Observer, Noldus, Wageningen, Netherlands). The following variables were quantified: 1) percentage of pups grasping the nipple, 2) latency to oral grasping, and 3) number of oral movements after grasping. Only the inguinal nipples were presented, thus, one female was used for testing of four pups. After the tests, all parental pairs were returned with their pups into the breeding room.

The percentage and latency of nipple grasping are considered to index the attractive and appetitive potency of limonene. The number of mouth movements after grasping is taken as an index of the avidity of pups' sucking. Pups that failed to produce oral grasping response were conservatively assigned a latency of 120 s.

Statistical Analyses

To assess whether the data sets from each group followed a normal distribution, Shapiro-Wilk tests have been used (Statistica, Version 8, Statsoft France, Paris). Normal distribution was not demonstrated in most groups and non parametric statistics were thus used.

The oral grasping performance of a NLF nipple painted with limonene was compared for pups exposed to either limonene or water in the various conditions specified in the following Experiment, using Fisher's exact tests (% oral grasping) and Mann-Whitney tests (latencies to the nipple grasping and frequency of mouth movements during nipple grasping).

EXPERIMENT 1: Odor learning in association with suckling during 17-20 h

In newborn mice aged P1, the odor of infantile saliva began to induce oral grasping after association of maternal suckling during 24 h. Here, we verified first whether an arbitrary, neutral odorant (limonene) previously associated with maternal suckling during 17-20 h could similarly acquire the power of eliciting oral grasping of the unattractive nipple of a NLF. We then assessed the retention of this associative learning.

Methods

Training procedure. The pups used in Experiment A were born between 4:00 and 7:00 p.m.; their birth was directly watched by an experimenter. As shown in **Figure 15**, the pups were exposed to limonene (or water) during three periods of nursing occurring before 24 h of age: 1) from the completion of parturition and placentophagia by the mother up to 13-16 h during the night; 2) from 15 to 18 h after birth lasting for 2 h; and 3) from 19-22 h after birth and lasted for 2 h. The dam was removed from the home cage for 2 h. During this period, the male was kept with the litter and the cage was put on a heating plate with a temperature fixed at 40°C to limit potential effects of social stress and hypothermia. The cutaneous temperature of the pups was then maintained between 36.0 and 36.7°C (as measured with an infrared camera: FlirTM A320, Flir Systems, Danderyd, Sweden). Before the onset of pup exposure to the odorized mother, the male was removed from the cage to avoid any potential disturbance. Right before returning the mother to her litter, the solution of limonene or water was applied onto each of her nipples by a rotating rubbing movement of a glass stick for 5 s per nipple. To make sure that the odorant was effectively associated with the rewarding suckling context, we

observed that the pups began probing and suckling the mother after her reintroduction in the home cage.

Test conditions. At the end of the training procedure, the pups were again isolated in their home cage to be tested. Three groups were formed: **Limonene group 1** (abbreviate LIM 1, n=20 pups, from 5 litters) exposed to **limonene** during the 17-20 h training session and tested **1 h** after isolation; **Limonene group 2** (LIM 2, n=20 pups, from 5 litters) exposed to **limonene** during the 17-20 h training session and tested **3 h** after isolation; **Control group** (Control, n=19 pups, from 5 litters) exposed to **water** during the 17-20 h training session and tested **1 h** after isolation. The testing procedure is described in the General Methods section.

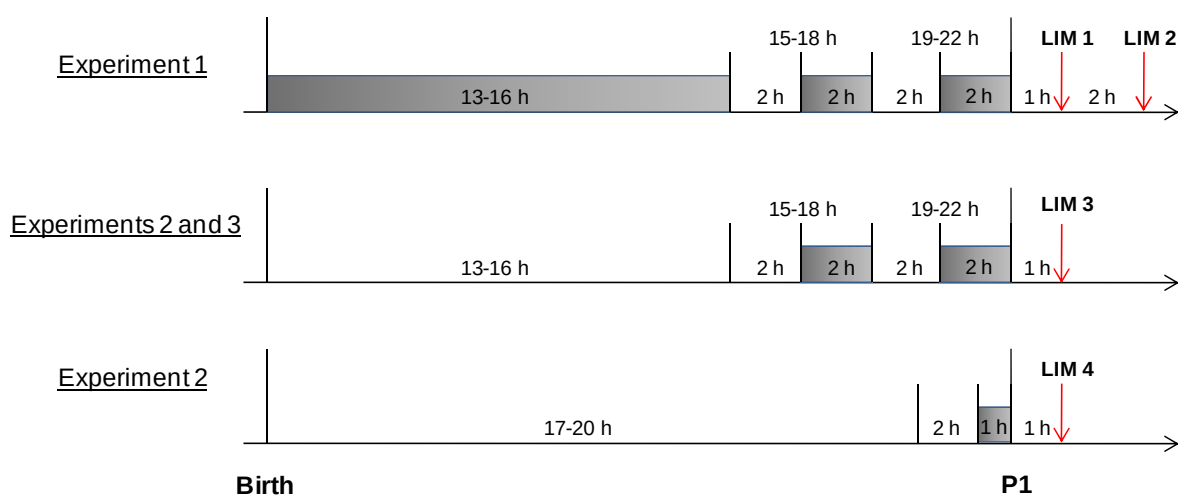


Figure 15. Time-line of the exposition procedure to the odorant (limonene) or the control stimulus (water) during the first postpartum day (P1).

Results

The results are depicted in **Figure 16**. First, 21% of pups of the **Control group** performed spontaneous grasping of a NLF nipple odorized with limonene. Thus, limonene does not spontaneously elicit a high rate of grasping and sucking in newborn mice. Second, LIM 1 pups displayed grasping of the odorized NLF nipple more frequently ($p < 0.001$), with shorter latency ($U = 295$; $p = 0.002$) and with more frequent mouthing movements ($U = 82$; $p = 0.001$) than the **Control group**. Thus, exposure to limonene during the first postpartum day, in association with nursing (including the first suckling) rendered limonene able to elicit oral grasping of a non attractive NLF nipple after a 1-h interval between end of exposure and the test. However, when tested after a 3-h retention interval, the LIM 2 pups showed lower sucking of the NLF nipple odorized with limonene than LIM 1 pups. These pups grasped the

NLF nipple less frequently ($p < 0.001$), with longer latency ($U = 119$; $p = 0.022$), and with less frequent mouthing movements ($U = 121$; $p = 0.025$) than the LIM 1 pups, indicating that the 17-20 h nursing-odor association may be lost after 3 h. Moreover, LIM 2 pups showed low suckling performance from NLF odorized nipple similar to those obtained by Control pups exposed to water during the 17-20 h exposure.

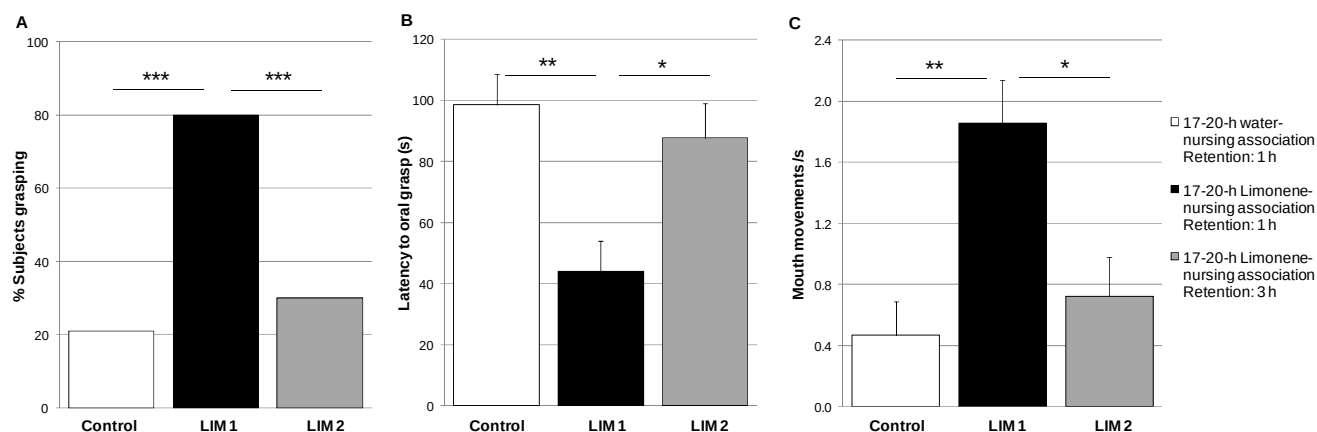


Figure 16. Oral grasping of 1 day-old newborn mice of a nipple from a non-lactating female odorized with limonene after different regimen of odor-nursing association and exposure-test intervals. A: Percentage of pups orally grasping the nipple (Fisher's exact test). B: Mean latency ($\pm$ SE) to the first nipple grasping (seconds), and C: Mean number ($\pm$ SE) of mouth movements per second during nipple grasping (Mann-Whitney test). Statistical significant differences ($p < 0.05$) between the groups previously pre-exposed to limonene (LIM 1 and LIM 2) and the blank group pre-exposed water (Control) were indicated with *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; $p < 0.05$.

EXPERIMENT 2: Rapid associative learning between an odorant and sucking

Experiment 1 highlighted that P1 pups were able to acquire limonene as a cue after 17-20 h of association with sucking and milk ingestion. Here, we examined whether shorter durations of associative episodes could ensure learning of limonene in 1 day-old pups. A previous study showed indeed that odor learning could be effective after shorter associative episodes with nursing in 3 day-old mouse pups (Armstrong et al., 2006).

Methods

Training procedure. To assess the efficacy of lower durations to establish learning of limonene in association with sucking in P1 mice, two different training procedures were conducted: 1) two periods of 2-h association of limonene with suckling; 2) one period of 1-h association of limonene with suckling (**Figure 15**). The durations of CS-US association were

modeled after other mouse studies (Armstrong et al., 2006; Bollen et al., 2012; Bouslama et al., 2005).

Test conditions. At the end of the training procedure, the mother was removed from the home cage for **1 h** before testing the pups. Two groups were defined: **Limonene group 3** (LIM 3, n=19 pups, from 5 litters) exposed to **limonene** during the two nursing periods of 2 h; **Limonene group 4** (LIM 4, n=20 pups, from 5 litters) exposed to limonene during one nursing period of 1 h. The testing procedure is described in the General Methods section.

Results

The **LIM 3 pups** evinced similar responsiveness than the **LIM 1 pups** in terms of frequency of oral grasping ($p=0.480$), latency to the first grasp ($U=173$; $p=0.633$) and number of oral movement during the grasping ($U=171$; $p=0.593$). The **LIM 4 pups** showed lower responsiveness to limonene than **LIM 3 and LIM 1 groups**. However, the former group's performance differed only from that of LIM 1 pups in that they expressed less frequent oral grasping responses ($p=0.023$; **Figure 17**).

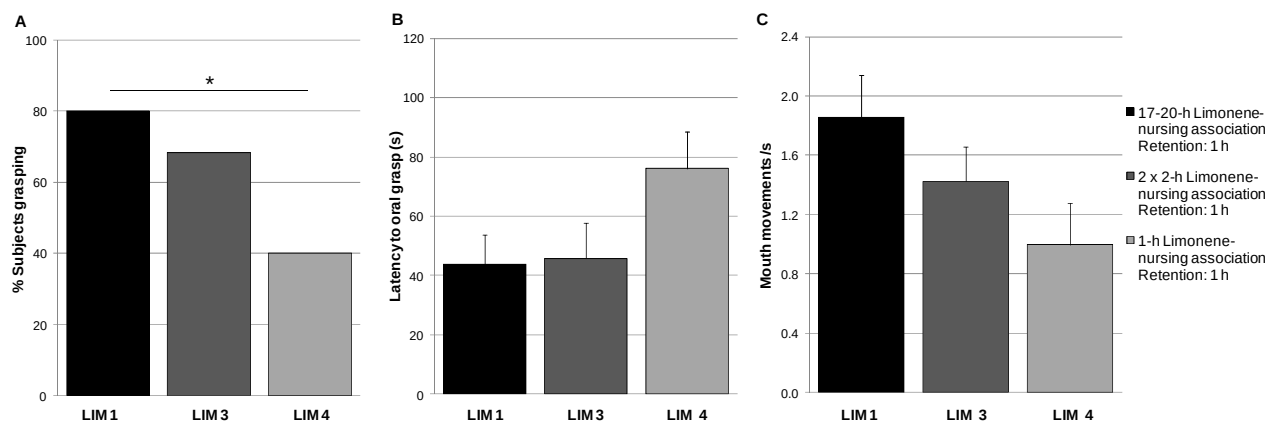


Figure 17. Oral grasping of 1 day-old newborn mice of a nipple from a non-lactating female painted with limonene. A: Percentage of pups orally grasping the nipple (Fisher's exact test). B: Mean latency ($\pm$ SEM) to the first nipple grasping (seconds), and C: Mean number ($\pm$ SEM) of mouth movements per second during nipple grasping (Mann-Whitney test). Statistical significant differences ($p < 0.05$) between the group previously pre-exposed to limonene during 17-20 h (LIM 1) and the groups shortly pre-exposed to limonene during either, 2 x 2 h (LIM 3), or 1 x 1h (LIM 4) with the maternal suckling, were indicated $*p < 0.05$.

EXPERIMENT 3: Effect of mere exposure to the odor on oral grasping

Experiment 2 determined that two periods of 2 h of CS-US association were sufficient to induce odor-based oral grasping in P1 mice. Here, we tested whether suckling is necessary to engage this learning or whether mere exposure to the odor suffices to it.

Methods

The training consisted in exposing the pups to the odorant in the nest without sucking opportunity. The nest, comprising the litter, was covered with a Petri dish (diameter x height: 8.5 cm x 2.5 cm; **Figure 18**) which bottom was tapped with blotting paper (2.5 x 2.5 cm; absorbant universel, 3M PowerSorb p-110) soaked with 50 μ L of limonene. The bottom of the Petri dish was pierced to keep aeration. The pups were not in physical contact with the odorized blotting paper. This device was applied in the same temporal conditions as the LIM 3 group, i. e., two periods of 2 h (LIM ME, n=15 pups, from 4 litters). The testing procedure is described in the General Methods section.



Figure 18. The device used to collectively expose the pups to the experimental odorant in the nest.

Results

As compared to the LIM 3 group, the pups **merely exposed** to limonene during two episodes of 2 h showed less frequent oral grasping of the NLF nipple odorized with limonene ($p=0.037$), with a slower grasping response ($U=60$; $p=0.002$; **Figure 19**).

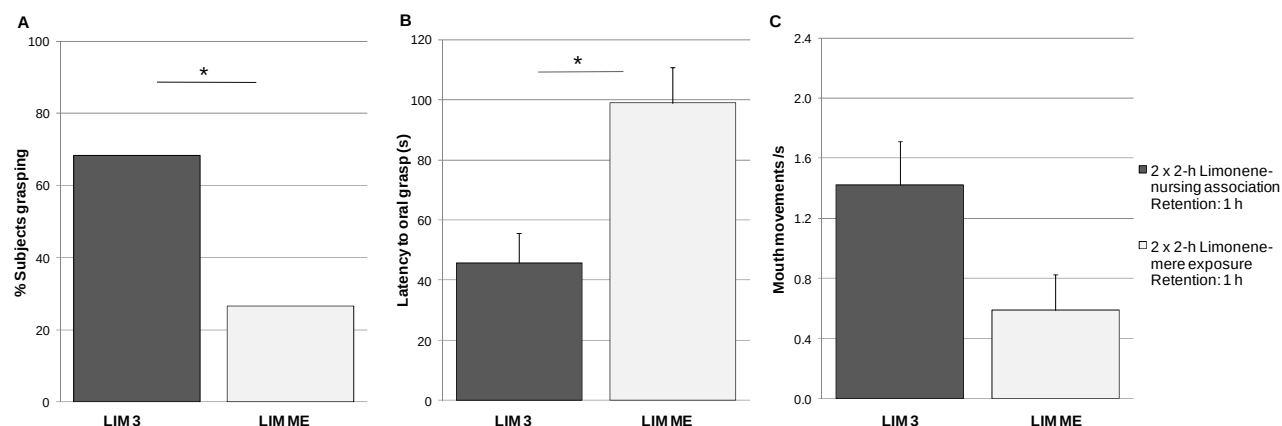


Figure 19. Oral grasping of 1 day-old newborn mice of a nipple from a non-lactating female painted with limonene. A: Percentage of pups orally grasping the nipple (Fisher's exact test). B: Mean latency ($\pm$ SEM) to the first nipple grasping (seconds), and C: Mean number ($\pm$ SEM) of mouth movements per second during nipple grasping (Mann-Whitney test). Statistical significant differences ($p < 0.05$) between the groups previously pre-exposed to 2 x 2h limonene, either merely in the ambient air of the nest (Lim ME) or in association with the maternal suckling (LIM 3), were indicated $*p < 0.05$.

DISCUSSION

This study aimed to begin assessing associative learning and memory abilities in newly born mice on their first day of life. Experiment 1 showed that 17-20-h pairing of a novel odorant with sucking yielded conditioning of oral grasping and sucking behavior. Although retention was effective 1 hour after the end of training, the conditioned preference appeared to be lost within the next 3 hours. Moreover, two periods of 2 h of odor-nursing association were sufficient to induce odor learning, but not one single period of 1 h nursing-odor association (Experiment 2). Finally, the associative learning of the neutral odorant depends on the pup's effective suckling experience and not on the fact of being merely exposed to it (Experiment 3). So far, the odor conditioning studies on newborn mice used place preference tests (olfactory double-choice arena) for which newly born (P0-P1) pups have too limited motor abilities. Here, we obtained reliable results using both a naturalistic learning training protocol and a performance test adapted for neonatal mice aged 1 day-old and less.

These findings are further discussed along: 1) the role of associative learning in the elicitation of grasping and sucking; 2) the rapid acquisition of the odor conditioning; and 3) the inefficiency of a mere odor-exposure to condition the grasping-sucking response.

Associative learning in the induction of the oral grasping

The nursing context constitutes a concentrate of sensory and physiological rewards. For example, infantile saliva appeared to need a 24 h exposure in contingency with **suckling** to become behaviorally active (section II.2). Similarly, limonene became effective after a 17-20-h exposure period with suckling. The subsequent cueing efficiency of limonene for nipple grasping was however limited to a 1-hour delay after the end of contingency exposure. Older mouse pups of the outbred CD-1 strain (P3, P6 and P10) were shown to retain the associative value of the odor for longer spans (3 h) after shorter contingency exposure with the suckling (1 h) in an exploration test (Armstrong et al., 2006). Therefore, this short retention of the odor conditioning in newborn mice may be dependent on the *ages* and/or the *strain* and/or the test procedure used (exploration test versus oral grasping test).

At this exploratory stage of our investigation on neonatal odor learning in the mouse, it is not possible to decipher which facet of the nursing context impinges most on the early engagement of the odor as a cue to nipple grasping/sucking. More advanced research in the newborn rat has shown that pre-ingestive stimulations, such as maternal licking or its mimic by stroking (McLean et al., 1993; Pedersen et al., 1982), thermal stimuli (Pedersen et al., 1982), or ingestive and post-ingestive conditions, such as (bovine) milk ingestion or gastric infusion (Arias et al., 2007; Brake, 1981; Cheslock et al., 2000), or a sweet tastant (Cheslock et al., 2000; 2004), can all result in the learning of an odor as a conditioned cue. For example, a study showed that rat pups aged of 3 and 6 days retained an artificial odorant after a one-trial association between the odor and oral *infusions of milk* (5µL) for 24 h (Johanson & Hall, 1982). Likewise, 3 h- and 1 day-old rat pups demonstrated 24-h retention of the conditioned preference for an odor after its pairing with 5 µL of saccharin (Cheslock et al., 2004). Using another type of positive rewarding, P1–P6 mice displayed conditioned responses to an odorant acquired by association with 10-min *tactile stimulation* (stroking), right after training (0-h delay); but, then, these pups lost this odor preference 5 and 24 h after the last association (Bouslama et al., 2005). However, 6 day-old rat neonates trained to a similar tactile conditioning memorized the conditioned response for at least 24 h, but less than 48 h (McLean et al., 2005; Sullivan & Leon, 1987). Regarding *thermal conditioning*, mouse pups alternatively exposed to an odor CS paired with either cold or warm temperatures during a 9-min acquisition procedure showed preference for the odor previously paired with the warm temperature immediately after acquisition. In accordance with our results, P3-P10 pups of the

C57BL/6 strain showed a preference for the CS odor only immediately and 1 h after acquisition but no conditioned preference was observed from 2 h to 4 h after acquisition (Bollen et al., 2012).

These data suggest that the retention of the behavioral activity of the artificial odorant is however highly dependent on the nature of the SI, the duration of the associative episodes, the postnatal age of the newborn, and notably the species. Except few studies which used oral grasping tests (Cheslock et al., 2000, 2004; Perdersen et al., 1982), the major part evaluated associative and mnesic capabilities of neonatal with exploration tests. Therefore, performance of conditioning could be dependent on the task used.

Rapid associative learning between odor and maternal suckling

In Experiment 2, the success of learning the experimental odor appears positively related with the duration of odor-nursing pairing. Indeed, the percentage of pups grasping the limonene-scented nipple decreased in function of the duration of exposure to limonene: 80% (17-20 h pairing, 3 periods of association), 68 % (4-h pairing, 2 periods of 2 hours), and 40 % (1-h pairing, 1 period of 1 hour). This result differs from those obtained in CD-1 mice aged P3, P5, or P10 that needed only a 1-h nursing-odor association to exhibit a preferential exploration towards this odorant (Armstrong et al., 2006). However, such conditioned preferences in the mouse pups were shown in a double-odor choice arena, but not in the suckling context. Therefore, it is conceivable that the P1 pups in our study were able to acquire the olfactory learning after a 1-h association, but did not show it in our test conditions. Nevertheless, in rats, after a brief odor-milk ingestion pairing, rats pup aged of 3-to-5 hours sustain attachment to the empty surrogate nipple when the odorant CS alone is exposed again for at least 1 h later (Cheslock et al., 2000). Thus, the odor-conditioning task, the postnatal age of the newborn as well as the species, might be determinant in the learning outcome.

Odor familiarization is not sufficient to elicit oral grasping response

Our preliminary data raise that one or several facets of the nursing situation are necessary to establish limonene as an efficient cue to nipple grasping. Mere exposure to limonene for the same duration than the nursing-related association indicates indeed no learning, or at least no learning that is demonstrable in our nipple-attachment test. Nevertheless, previous studies have reported that early mere odor exposures can result in behavioral and neural changes for the familiarized odor (mouse: Tazir et al., 2011; Todrank et al., 2005; rat: Coopersmith et al.,

1986). For example, a 3-min exposure to a novel odorant consistently increased subsequent preference for that odor in P10 and P15 rats in a two-way preference test (Caza & Spear, 1984). Otherwise, a 4-h odor exposure repeated daily for 2 weeks in either a mere exposure condition or in an associative condition (with a foster non lactating or lactating female) induced P15 pup's preferences to the odors in a two-choice huddling tests. However, the association between the odorant and maternal contact or mimics (lactating female, non lactating female, or a warm surrogate) induced stronger preference than those resulting from the mere familiarization (Alberts & May, 1984). In another study, P0 rat pups were more active than non-exposed pups when they were re-exposed to a odor. But this effect was no more effective in P1 pups, which did not display differential activity after pre-exposure or not (Miller & Spear, 2010). Further, rats exposed to an odor for 1 hour shortly after birth, responded at 4-5 hours postpartum with higher levels of activity to this odor as compared to non-exposed pups, and this odor pre-exposure also decreased the latency to attach to a similarly odorized surrogate nipple (Miller & Spear, 2008). Generally, these studies showed that a mere odor exposure can condition the olfactory preference and the general behavioral activity in newborn rats.

The lack of effect of mere exposure noted here in mouse pups could be explained by the fact that it might condition general locomotor responses, like exploration or cephalic orientation, rather than specific responses such as oral grasping. Another possibility may be that contrary to P0 pups, P1 pups have prior experience with the mother, and therefore, a novel odor without reward might not be salient, or even aversive to them. At birth, it may be adaptive for a pup to positively react to the odors experienced first because there is high probability that they belong to the dam (Miller & Spear, 2009). However, results remain controversial between studies (Alberts & May, 1984; Caza & Spear, 1984; Miller & Spear, 2010) and further work is needed to clarify these issues.

Upcoming work will have to pursue the earliest steps of the ontogeny of neonatal associative encoding and memory abilities in mouse pups. Amniotic fluid and murine milk being immediately attractive and appetitive at birth, it will be particularly interesting to assess whether these fluids can transfer their reinforcing potency to any neutral odorant that may be associated with them.

3.3) Conclusion

Cette étude s'est attachée à mieux caractériser les processus d'apprentissage impliqués dans le succès du comportement de tétée au cours du développement du souriceau. Il est apparu que le contexte de tétée constitue un renforcement puissant permettant de transférer le pouvoir inducteur de saisie de la tétine à une odeur neutre (limonène), suite à une longue association de 17-20 h entre le limonène et la tétée, et cet apprentissage est mémorisé pendant 1 h. Par contre, cet apprentissage associatif semble disparaître après un temps de rétention de 3 h. Par ailleurs, deux associations de 2 h entre le limonène et la tétée se sont avérées suffisantes pour que le limonène devienne inducteur de la tétée, contrairement à une association d'1 h. Enfin, cette acquisition repose sur un mécanisme d'apprentissage associatif, et non sur un mécanisme de familiarisation par simple exposition de l'odorant dans l'environnement du nid.

Ces résultats diffèrent, toutefois, de ceux obtenus chez des souriceaux de souche CD-1 de 3, 6 et 10 jours, qui ont été testés à peu près dans les mêmes conditions expérimentales que dans notre étude (Armstrong et al., 2006). Ces souriceaux sont capables d'associer une odeur neutre à la tétée et affichent une préférence envers cette odeur lorsqu'elle est présentée 3 h après l'association. Les faibles performances de tétée rapportées dans notre étude peuvent s'expliquer par des différences liées soit à l'âge des souriceaux (P1), soit à la souche testée. De façon générale, il est apparu que les rats sont plus performants dans l'acquisition et la rétention de l'apprentissage olfactif associatif. La durée d'association est souvent plus courte, allant de quelques secondes à quelques minutes, alors que la durée de rétention est au moins de 24 h, pour des nouveau-nés âgés de plusieurs heures à quelques jours de vie postnatale (rat : Cheslock et al., 2004 ; Johanson & Hall, 1982 ; Miller & Spear, 2008, 2010). Cependant, peu d'études ont réellement mis en évidence que la tétée renforce les apprentissages olfactifs et confère à une odeur neutre le pouvoir d'induire la saisie orale d'une tétine (excepté : Cheslock et al., 2000, 2004; Perdersen et al., 1982 ; Miller & Spear, 2008). En effet, la plupart des recherches ont testé la réponse néonatale à l'aide de tests de double-choix olfactifs et ont ainsi identifié une préférence olfactive envers l'odeur conditionnée. Nous émettons donc l'hypothèse que les capacités d'acquisition et de rétention de l'apprentissage olfactif relativement modérées dans notre étude, seraient principalement dues à la spécificité de la tâche, référant à l'induction du comportement spécifique de saisie orale.

Il faut enfin souligner que le contexte de tétée comporte de nombreux stimuli inconditionnels apportant des renforcements positifs de nature ingestive (lait), mécanique (suction),

thermique (chaleur maternelle), tactile (léchages maternels) et olfactive (lait). On peut alors se demander par quel(s) agent(s) de renforcement le limonène a-t-il pu acquérir son pouvoir inducteur de saisie orale de la tétine et de la tétée ? Aucune étude n'a, à ce jour, examiné si l'odeur de lait murin peut intervenir comme renforçateur lors d'un apprentissage associatif. Notons que, chez le lapin, l'apprentissage associatif est possible par le renforcement olfactif de la phéromone mammaire (Coureaud et al., 2006a). Ces éléments de discussion fournissent donc des pistes de recherches qui nous permettraient de mieux appréhender la nature et le fonctionnement des processus d'apprentissage impliqués dans l'initiation du comportement de tétée.

Des expériences complémentaires ont été réalisées et sont décrites dans l'Annexe 3.

III) FACTEURS TEMPORELS DANS L'EMISSION D'INDICES ODORANTS PAR LA MERE ET LEUR PERCEPTION PAR LES NOUVEAU-NES

Préambule

Dès la naissance, les nouveau-nés se doivent d'interagir rapidement et efficacement avec la femelle allaitante afin de trouver les tétines pourvoyeuses de lait. La partie II a mis en lumière que l'odeur de lait elle-même induisait des réponses pré-ingestives et ingestives chez des souriceaux. L'ingestion de lait stimule aussi les apprentissages olfactifs des odorants associés. De leur naissance jusqu'à la deuxième semaine de vie, le lait est l'unique aliment ingéré par les souriceaux. Chez l'espèce souris, plusieurs femelles peuvent occuper le même nid et mettre bas, de façon plus ou moins synchrone, favorisant ainsi un maternage en commun (Hayes, 2000). Les soins et allaitements en communs ont d'ailleurs été fréquemment rapportés en laboratoire (König, 1994 ; Sayler & Salmon, 1971), en milieu semi-naturel (Manning et al., 1995), aussi bien qu'en milieu naturel (Wilkinson & Baker, 1988). Chez la souche BALB/c, les femelles allaitantes expriment des comportements d'allaitements communs uniquement lorsque les naissances ne sont pas décalées de plus de 5 jours ; les mères d'âges lactationnels précoces produisant des comportements agressifs envers des souriceaux plus âgés (Sayler & Salmon, 1969, 1971 ; cités par Weber & Olsson, 2008). Par conséquent, la capacité des nouveau-nés à discriminer entre des femelles étant à des périodes de lactation différentes, ou entre des laits d'âges lactationnels différents, en se basant sur leurs odeurs respectives, optimiserait la localisation, l'accès et l'ingestion d'éléments nutritifs et immunitaires adaptés à leurs besoins développementaux.

Une covariation entre les propriétés olfactives du lait et les réponses sélectives des nouveau-nés pourrait avoir plusieurs avantages adaptatifs : 1) dans les premiers instants suivant la naissance, le nouveau-né doit s'orienter rapidement en direction des tétines maternelles et entrer efficacement en contact avec l'une d'entre-elles ; une telle sensibilité et attirance des souriceaux pour la tétine maternelle devrait être maximale à la naissance pour faciliter le succès des premières tétées ; 2) la survie du nouveau-né va dépendre de sa capacité à ingérer rapidement après la naissance un nouveau fluide nutritif, le colostrum ; des composés actifs présents dans le colostrum pourraient temporairement en augmenter l'acceptabilité pendant la période particulière des premières tétées ; 3) les apports du lait et les besoins néonataux doivent être ajustés au cours du développement, afin d'optimiser l'accès aux ressources immunitaires, nutritives, endocriniennes par les nouveau-nés à des moments adaptés du développement (Goldman, 2000 ; Newburg, 2001) et les propriétés chimiosensorielles du lait pourraient refléter ces différentes fonctions ; 4) il serait envisageable que le lait puisse contenir des composés actifs qui régulent la réponse comportementale du nouveau-né tout au

long de son développement pour que les apports du lait puissent être efficacement assimilés par l'organisme et convertis en biomasse ; 5) le lait pourrait délivrer des composés qui stimulent l'apprentissage précoce des signaux associés à la source de lait et à l'identité de la mère ; 6) à la fin du cycle de lactation, la femelle pourrait réduire l'attractivité du lait pour faciliter le passage de la progéniture à l'alimentation solide. Ces différents aspects soulignent qu'une covariation entre propriétés chimiosensorielles du lait et préférences olfactives infantiles pourrait faciliter l'adaptation de la progéniture aux deux périodes les plus critiques du développement, la naissance et le sevrage.

Dans cette Partie III de la thèse, nous examinerons, au travers de trois études, s'il existe une période au cours de la lactation durant laquelle le lait serait plus ou moins réactogène pour les souriceaux. Dans les deux premières études, des souriceaux de différents âges ont ainsi été exposés à des laits murins de leur propre lignée, et prélevés à différents stades de lactation, afin d'évaluer les réponses néonatales à l'égard d'éventuelles fluctuations de la composition du lait. Dans la première étude, des souriceaux de 2, 6 et 15 jours de vie ont été évalués quant à leur exploration préférentielle envers des laits de 2, 6 et 15 jour postpartum. Ensuite, la deuxième étude s'est attachée à examiner les préférences olfactives des souriceaux à la naissance (P0), avant ou après une expérience de tétée, lorsqu'ils étaient présentés simultanément au colostrum et à des laits de lactation plus avancés dans un test de double choix olfactif. Enfin, la troisième et dernière étude a évalué si les réponses néonatales envers des laits d'âges lactationnels différents sont généralisables à des laits d'autres souches de souris.

1) SELECTIVITE DES SOURICEAUX EN DEVELOPPEMENT FACE AUX ODEURS DE LAITS D'AGES LACTATIONNELS DIFFERENTS

1.1) Introduction

Les souriceaux d'âges précoces expriment des réponses avides envers des odeurs émises par les structures mammaires, et plus spécifiquement, les sécrétions lactées (voir sections II.1 et II.2). Par ailleurs, la composition du lait murin fluctue fortement tout au long de la période de lactation, au moins en termes de macronutriments (Görs et al., 2009; Grueters et al., 1985; Knight et al., 1986; Ragueneau, 1987 ; Rijnkels et al., 1997 ; Riley et al., 2006 ; Yoneda et al., 2001). Par conséquent, cela nous laisse supposer que le profil olfaction du lait pourrait également fluctuer au cours de la lactation.

Cette étude a pour objectif d'étudier s'il existe une période, au cours de la lactation, durant laquelle le lait serait plus ou moins réactogène pour les souriceaux. Le pouvoir attractif du lait murin a été caractérisé en évaluant les réponses préférentielles de souriceaux de différents âges pour des laits prélevés chez des femelles à différents stades de lactation.

1.2) An odor timer in milk? Synchrony in the odor of milk effluvium and neonatal chemosensation in the mouse⁵

Syrina Al Aïn, Laurine Belin, Bruno Patris, Benoist Schaal

ABSTRACT

Mammalian newborns exhibit avid responsiveness to odor compounds emanating from conspecific milk. Milk is however developmentally heterogeneous in composition as a function of both evolved constraints and offspring demand. The present study aimed to verify whether milk odor attractivity for neonates is equally distributed along lactation in *Mus musculus* (Balb-c strain). Therefore, we exposed pups varying in age to milk samples collected from females in different lactational stages. The pups were assayed at postnatal days 2 (P2), 6 (P6) and 15 (P15) in a series of paired-choice tests opposing either murine milk and a blank (water), or two samples of milk collected in different stages of lactation [lactation days 2 (L2), 6 (L6), and 15 (L15)]. Pups of any age were able to detect, and were attracted to, the odor of the different milk. When milk from different lactational stages were simultaneously presented, P2 pups oriented for a similar duration to the odors of L2 and of L6 milk, but significantly less to the odor of L15 milk. Next, P6 pups roamed equivalently over L2 and L6 milk odors, but still less over the odor of L15 milk. Finally, P15 pups explored as much L15 milk odor as the odors of both L2 and L6 milk. This developmental shift in milk attractivity is discussed in terms of changing chemosensory properties of milk and of shifting chemosensory abilities/experience of pups.

Keywords: Milk; Olfaction; Laboratory mouse (*Mus musculus*); Newborn; Mother-infant relations; Behavioral development.

Running Head: Milk odor and neonatal olfaction synchrony

⁵ Article sous presse dans Public Library of Science ONE, 7, e47228
DOI: 10.1371/journal.pone.0047228.

INTRODUCTION

Newborns from any mammalian species studied so far show avid responsiveness to odor cues emitted by mammary structures, especially in milk or mammary secretions (Schaal, 2005; 2010, for reviews). Milk is indeed affluent in odor-active compounds (Buettner, 2007; Moio et al., 1996; Schaal et al., 2003; Shimoda et al., 2000). But it is also constantly changing in composition and its olfactory profile is expected to fluctuate accordingly. In addition to individual variations linked with a female's genetic background and habitus (ecological niche, diet), milk composition is indeed physiologically determined along several time scales: i.e., the female's reproductive stage (parity, co-occurring lactation and pregnancy), lactational phase (colostral, transitional, mature milk), time of day (morning vs. evening milk), and the nursing cycle (fore- vs. hindmilk). Evidence for compositional milk variability over time comes mainly from studies on macro- and micronutrients, and bioactive peptides (German et al., 2002; Hamosh, 2001; Jensen, 1995), but very seldom from studies on the chemosensory correlates of such constituents or on how newborns react to them. So far, the evidence for neonatal responses to time-bound sensory properties of milk is meager and controversial (Coureaud et al., 2008; Drewett, 1982; Hall, 1975; Keil et al., 1990; Nysenbaum & Smart, 1982).

Covariation between milk odor and infant perception supposes that milk composition is reflected in its odor/flavor properties and that neonatal organisms can detect them. The nutritional, immunological and chemocommunicative requirements of newborns changing over the course of development, and the composition of milk being adjusted accordingly (Ofstedal & Iverson, 1995; Veloso et al., 2003), an offspring's ability to discriminate between females that are in different lactational stages, or between their milk, may promote the intake of developmentally-appropriate nutritive and protective elements, especially in the case of species practicing shared suckling or communal nursing.

The present study aimed to address whether there are periods in lactation during which milk would carry stronger olfactory potency for newborns. It was run in the mouse because newborn pups were shown to respond to conspecific milk odor (sections II.1 and II.2) and because mouse milk compositional fluctuations are known during the first days of lactation and between weeks 1 and 2 of lactation (Görs et al., 2009; Knight et al., 1986; Ragueneau, 1987; Richards & Beardmore, 1984; Sun et al., 2002), assuming odorous metabolites would change correlatively. To assess neonatal responses to hypothetical fluctuations in milk odor, we

used a nested method in exposing infant mice of varying ages (potentially changing in olfactory abilities) to milk collected from females in different lactational stages (potentially varying in odor properties). The paucity of related data from other mammalian taxa provides a poor heuristic ground for predictions. However, it might be suggested that behaviorally-potent odorants, if any, should be emitted in higher concentration when the selective constraints on offspring are maximal. In this case, mouse pups from any age should react more avidly to early-lactation than to late-lactation milk. A second possibility assumes a degree of adaptive matching between the biological impact of milk, its sensory properties, and offspring chemoreceptive selectivity. Accordingly, mouse pups might olfactorily react more to a milk matched with own age because of its beneficial interoceptive impact. A third possibility would suggest that pups do positively react to any milk from previous lactational stages because they have got opportunities to sense and learn them. Finally, as maternal behavior of *Mus musculus* involves communal nursing (König, 1994; Weber & Olsson, 2008), an opportunistic strategy might be adaptive, and non-age-selective responsiveness to milk odor might be envisioned accordingly. There is no a priori ground to privilege one among the above hypotheses, and the present work is intended to begin sorting them out based on behavioral assays.

GENERAL METHODS

Ethic Statement

The French national and local rules concerning the use of laboratory animals were strictly followed. The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Burgundy (Protocol N° 20-09; Authorization of experimentation n° 21 CAE 059). To maximize and standardize their responsiveness, the pups were separated from the mother for 4 hours before testing. During that pre-test separation, the male was kept with the litter, and the cage was put on a heating plate (temperature fixed at 38°C), to limit potential effects of social stress and hypothermia. To prevent thermoregulatory stress, all assays were performed on another heating plate which temperature was set at 33°C. Females were milked to obtain fresh milk. Milking was done only once during a lactation cycle. After the test, before being returned to their home cage, the anaesthetized lactating females were laid down in an individual cage placed on a heating plate, and looked after until complete wake up. No adverse effect of the anesthetic was noted on maternal and pup behavior: the females resumed

normal maternal care (nursing, licking) and all pups were successful in sucking. The number of stimulus females used in the discrimination tests was reduced to one female for 2 litters tested. Handling and/or testing effects on newborn pups were kept minimal in designing brief tests (2 min). The number of tested pups was kept as low as possible, but sufficient to ensure statistical validity of data.

Animals and housing conditions

BALB/c mice (*Mus musculus*, Charles River, L'Arbresle, France) were housed in standard Plexiglas cages (28 x 17 x 13 cm). Males were left with females to favor their parental contribution and ensure conception at postpartum estrous. The animals were kept under constant 12:12 h light/dark cycle (light on at 8 a.m.) and temperature (20-22°C). Water and pellets (SAFE, Augy, France) were provided *ad libitum*. The animals were fed the same pelleted chow throughout the study, composed of 21.4% of protein, 5.1% of fat, 5.7% of ash (mineral material) and 4% fibers. Pellets were constituted from wheat, corn, wheat bran, barley, extruded soya seeds, soya meal, condensed fish soluble, yeast, calcium carbonate, dicalcium phosphate, and vitamin (A, E and D3) and oligoelement (copper sulfate pentahydrate) premixes. The breeding cages were lined with wood sawdust (SAFE, Augy, France). The number of pups by litter was culled to 6 to standardize pup competition at nursing.

Test Animals

Neonatal mice (n = 381, from 112 litters) were tested on postnatal days 2 (P2), 6 (P6) or 15 (P15) (P2: n=129 pups from 42 litters, P6: n=123 from 35 litters, or P15: n=129 from 35 litters). The day of parturition was deemed as P0. These ages were chosen because: 1) up to P17, mouse pups are exclusively suckled (König & Markl, 1987; Williams & Scott, 1953), hence deriving food-related chemosensory experience from milk (no data found on the initiation of cæcotrophy in *Mus*); 2) major changes in mouse milk composition occur during the first postpartum days and between weeks 1 and 2 (Görs et al., 2009; Knight et al., 1986; Ragueneau, 1987; Richards & Beardmore, 1984; Sun et al., 2002), leading to compare pup responses to milk odor during week 1 (P2 vs. P6 comparison) and between weeks 1 and 2 (P2-P6 vs. 270 P15 comparison). Pups were tested in only one assay. To prevent litter effects, at most 5 pups of a same litter were tested in a same experiment.

Stimuli

Fresh milk was collected from 129 unfamiliar lactating females (LF) on different days of lactation: 47, 39 and 43 on lactation days 2 (L2), 6 (L6) and 15 (L15), respectively. P2, P6, and P15 groups of pups were exposed to the L2 milk from 19, 14, and 14 LF; to the L6 milk from 13, 13, and 13 LF, and to the L15 milk from 15, 13, and 15 LF. A pup was never exposed to the milk from its own mother. The control stimulus consisted in mineral water.

Donor females were first separated from their litter for 2 h (a procedure that did not affect subsequent milk production [König et al., 1988]). They were anaesthetized by an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (Imalgène 1000, Vibrac, France; dose: 45 mg/kg in NaCl .9%) and xylazine (Rompun 2%, Bayer, Puteaux, France; dose: 5 mg/kg in NaCl .9%). The females were then injected intraperitoneally with 0,15 mL of oxytocin (Intervet, Unterschleissheim, Germany) and gently massaged on the mammary areas to stimulate milk let-down (DePeters & Hovey, 2009; Devinoy et al., 1995). Each nipple was aspirated with a Pasteur pipette (2 mL). During the 15-min milking procedure, 0.5 to 1 mL of milk was collected and aliquoted into glass vessels kept on ice. The fresh milk was immediately used for the tests.

Test devices and procedures

Behavioral testing was run in a room adjacent to the breeding room to avoid interference with unwanted odor stimuli from conspecifics. Differential responses were quantified in a two choice paradigm using age-adapted devices/procedures (**Figure 20**). Poorly mobile P2 pups were exposed to a head-orientation assay where no general exploratory movements were required, while mobile P6 and P15 pups were assayed for differential exploration in age adapted choice arenas. For P15 pups (after eyes' opening), tests were run in red light during the dark period. For all assays, the test arena was put on a heating plate (28 x 20 cm; Gestigkeit, Düsseldorf, Germany) which temperature was set at 33°C. All tests were videotaped for 2 min to subsequently analyze the duration of pup orientation to, or approach of, either stimulus. These analyses were made blindly using the Observer software (Noldus, Wageningen, the Netherlands).

Behavioral assay for 2 day-old pups

Device: A head-orientation test was devised (adapted from Hepper, 1988). Blotting paper (Tork Universal Wiper 310 Centrefeed Roll, Göteborg, Sweden) was taped on the heating

plate. Two auto-adhesive labels (0.8 x 1.2 cm; ApliI Paper, Barcelona, Spain) were stuck bilaterally at 3 mm of the midline on the blotting paper, delimiting two equidistant areas. Twenty μL of stimulus were applied with a micropipette on each label.

Procedure and dependent variable: Pups were held between the gloved thumb and index (gloves: VWR International, Leuven, Belgium) to be first approached from each olfactory sources during 6 s without contact, following a pre-test procedure used with the neonates of other species (Macfarlane, 1975; Schaal et al., 1995a). Then, the test began when the body and head of the pup were aligned on the midline of the device. The pup body was held aligned during the whole test so that only cephalic motions were possible. The duration of head orientation to either stimulus was measured. An animal was considered to be oriented towards a stimulus when both of its nostrils crossed the midline of the device. Pups that did respond to this criterion were excluded from further analyses. The blotting paper and both labels were replaced after every trial.

Behavioral assay for 6 day-old pups

Device: It consisted in a rectangular polypropylene box (internal length x width x height: 7.1 x 5 x 7 cm) with a stainless steel mesh floor (mesh size: 3.14 mm^2) affixed so that it was 0.7 cm above the bottom. Under the mesh, two rectangular polypropylene plates (6.1 x 2.1 cm, 0.2 cm thickness) were inserted in two equal compartments (separated by a polypropylene barrier to avoid the mixing of odors). Forty μL of milk were spiked in standardized fashion on each plate placed to 2 mm under the mesh.

Procedure and dependent variable: Before testing, the pups were introduced for 6 s into each part of the arena separated by a polypropylene barrier. The order of this stimulus pre-presentation was at first random, and then counterbalanced at each other test. For the test itself, the pup was placed on the midline of the arena, and left free to move. The duration of exploratory roaming in the two halves of the arena was recorded. A pup was considered to be in one half of the arena when its entire muzzle crossed the midline. Pups that performed less than 3 midline crossings or that urinated were excluded from further analyses. All elements of the device were thoroughly washed with 95° ethyl alcohol and distilled water, and then dried.

Behavioral assay for 15 day-old pups

Device: The arena consisted in a rectangular polycarbonate box (16 x 11 x 13.5 cm) with a stainless steel wire-mesh (mesh size: 3.14 mm^2) placed 0.7 cm above the bottom. Under the

mesh, two equal compartments were delimited by a polypropylene barrier. Rectangular polypropylene plates (7.8 x 11 cm, 0.2 cm thickness) carrying the stimuli were inserted in each compartment. Sixty μ L of milk were spiked in a standardized pattern on each plate and placed at a distance of 2 mm under the mesh.

Procedure and dependent variable: The procedure described for 6 day-old pups was repeated here.

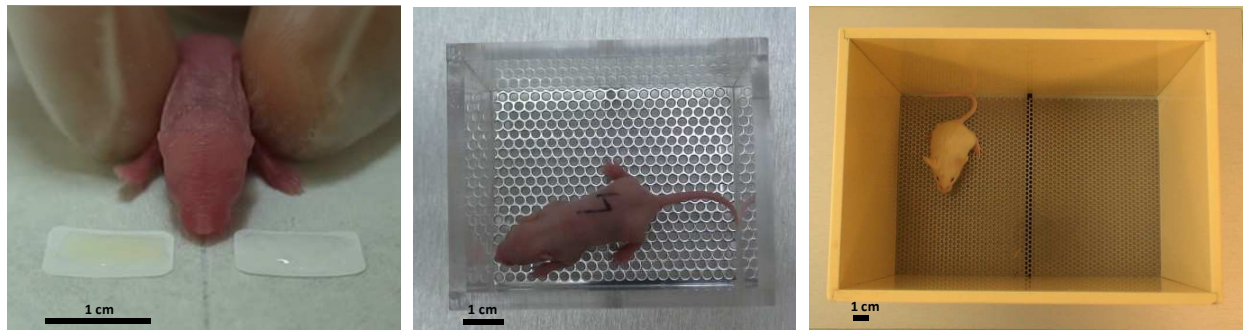


Figure 20. The devices used to assess differential attraction to paired odor stimuli for mouse pups aged 2, 6, and 15 days (top, middle, and bottom pictures, respectively).

Experimental groups

Eighteen experimental groups were formed. First, we assessed whether the odor of L2, L6 and L15 milk could be differentiated from water by P2, P6 and P15 pups. Three series of tests were run at each age opposing a milk sample and the control stimulus [L2 milk vs. water (P2 pups: n tested/n analyzed =26/20, P6: n=28/20, and P15: n=20/20; from 9, 5, and 6 litters, respectively); L6 milk vs. water (P2: n=22/20, P6: n=22/18, and P15: n=22/22; from 5, 5, and 7 litters, respectively), and L15 milk vs. water (P2: n=33/25, P6: n=24/18, and P15: n=24/24; from 7, 6 and 6 litters, respectively)].

Second, we examined whether different milk would convey more or less olfactory potency for P2, P6 and P15 pups according to the period of milk collection during lactation. Three series of tests were performed at each age contrasting the odors of two milk samples [L2 vs. L6 milk (P2 pups: n tested/n analyzed =31/22, P6: n=22/21, and P15: n=20/20; from 6, 5, and 5 litters, respectively); 5) L6 vs. L15 milk (P2: n=27/21, P6: n=25/20, and P15: n=20/20; from 7, 5, and 5 litters), and 6) L2 vs. L15 milk (P2: n=30/21, P6: n=34/26, and P15: n=23/23; from 8, 9, and 6 litters, respectively)].

Statistical Analyses

The Shapiro-Wilks test indicating non-normal distribution of data in most groups, non parametric statistics were used (Statistica 8, Statsoft, Paris, France). Thus, Wilcoxon tests were applied to compare the total time pups spent oriented to either side of the choice devices. Kruskal-Wallis tests yielded no significant litter effect ($0.90 < H < 10.88$, in all cases, $p > 0.05$) and no significant milk donor effect in any group ($0.03 < H < 9.70$, in all cases, $p > 0.05$).

RESULTS

Attraction towards the odor of milk from different lactational ages

As shown in **Figure 21**, P2 pups turned their muzzle significantly longer to the odor of L2, L6 and L15 milks than to the control stimulus (L2: $Z=2.557$, $p=0.011$; L6: $Z=2.763$, $p=0.006$; L15: $Z=1.672$, $p=0.048$; respectively). Likewise, P6 pups oriented significantly longer to L2, L6 or L15 milk odor than to water (L2: $Z=2.501$, $p=0.012$; L6: $Z=2.461$, $p=0.014$; L15: $Z=2.308$, $p=0.021$). Finally, P15 pups stayed significantly longer over L2, L6 or L15 milks than over the control stimulus (L2: $Z=2.053$, $p=0.040$; L6: $Z=2.029$, $p=0.042$; L15: $Z=2.143$, $p=0.032$). In sum, when presented against the control stimulus, the odor of milk from any lactational stage was detected by, and attractive to, pups of all the ages considered.

Relative attraction towards milk odors from different lactational stages

Here, we examined whether there are periods in lactation during which milk would be more or less olfactorily attractive to P2, P6 and P15 pups (**Figure 22**). When exposed to the odors of L2 and L6 milk, P2 pups oriented equivalently ($Z=0.689$, $p=0.485$). However, in the test opposing L2 milk odor and L15 milk odor, pups oriented significantly longer to the former than to the latter ($Z=2.728$, $p=0.006$). Likewise, in the test opposing L6 and L15 milk odors, the pups spent more time exploring the former than the latter ($Z=2.138$, $p=0.033$). In sum, L2 and L6 milks bear properties that confer them equivalent attraction in P2 pups. P6 pups roamed indiscriminately over L6 milk and L2 milk odors ($Z=0.330$, $p=0.741$). But, these pups oriented significantly longer to the L2 and L6 odors than to the L15 milk odor ($Z=2.324$, $p=0.020$ and $Z=2.053$, $p=0.040$, respectively). To sum up, L2 and L6 milk odors appear chemosensorily or motivationally equivalent, while both of these milks are treated differentially from L15 milk. Finally, P15 pups explored for equivalent durations the odor of

L2 milk and the odors of either L6 milk ($Z=1.531$, $p=0.126$) or L15 milk ($Z=0.030$, $p=0.976$). In addition, the odors of L6 and L15 milk were explored for similar durations ($Z=0.187$, $p=0.852$). Thus, P15 pups do positively react to conspecific milk odor regardless of the donor female's lactational stage.

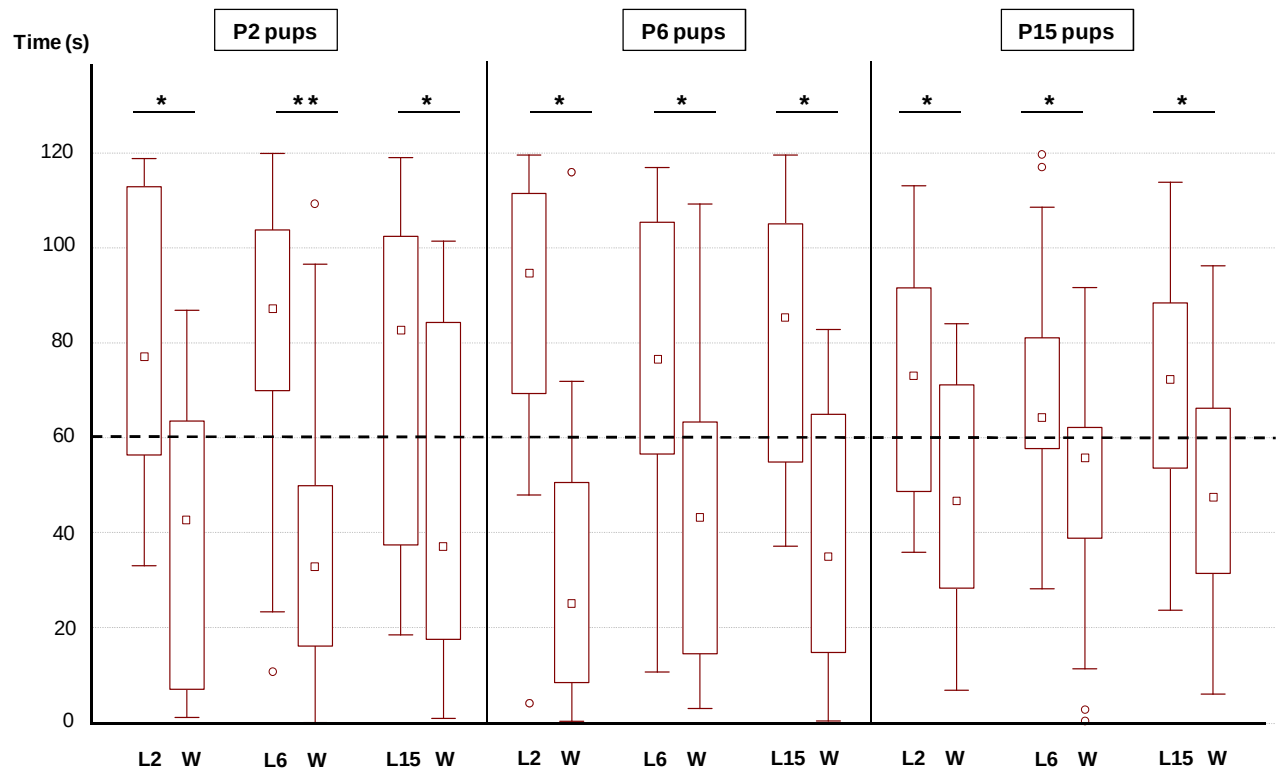


Figure 21. Absolute attraction to milk odors from different lactational stages against the control stimulus. Box plot of the duration 2, 6, and 15 day-old (P2, P6 and P15) mouse pups spent oriented to: 1) milk of lactation day 2 (L2) vs. water (W), 2) milk of lactation day 6 (L6) vs. water, and 3) milk of lactation day 15 (L15) vs. water. The dashed line indicates the theoretical level of random orientation. Wilcoxon's tests: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. The central square within the box represents the median; the box encloses the interquartile range; whiskers show 1.5 times the interquartile range, "o" indicate outliers.

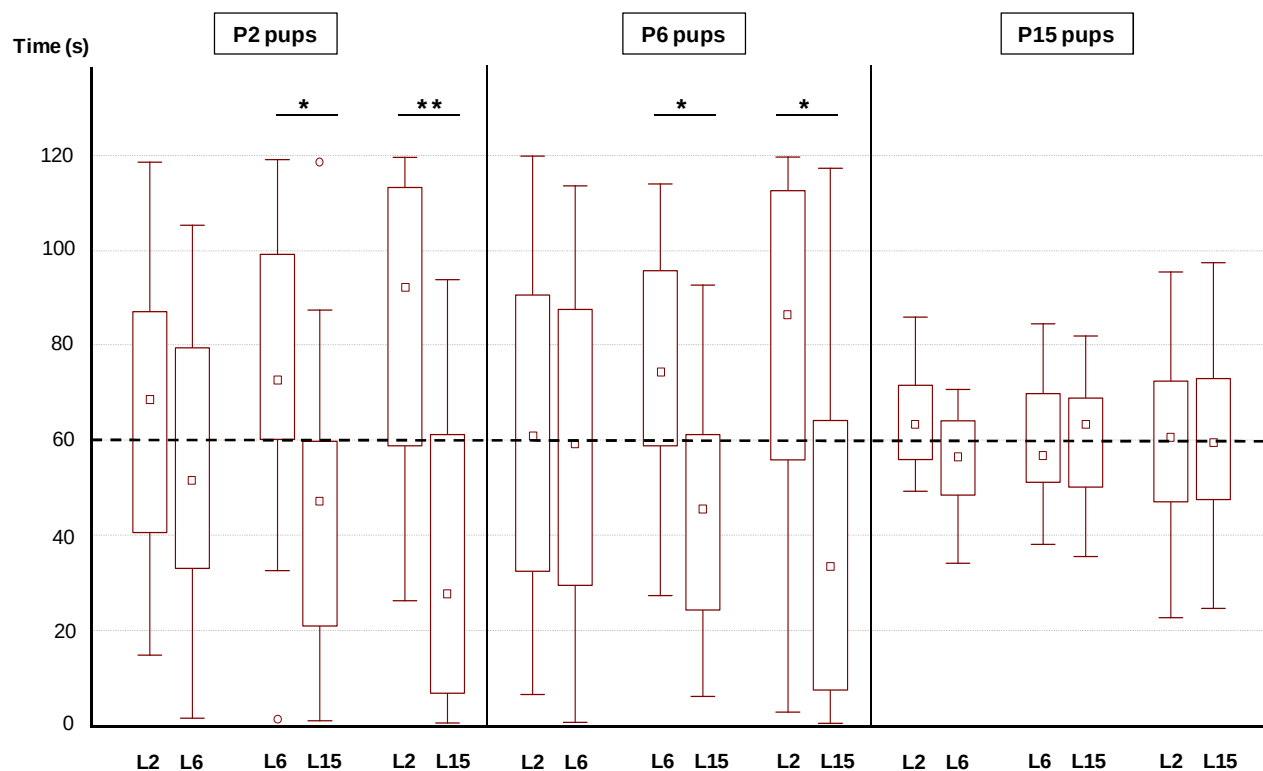


Figure 22. Relative attraction to the odors of milk samples from different lactational stages. Box plot of the duration 2, 6, and 15 day-old (P2, P6 and P15) mouse pups spent oriented to: 1) milk of lactation day 2 (L2) vs. milk of lactation day 6 (L6), 2) milk of lactation day 2 (L2) vs. milk of lactation day 15 (L15), and 3) milk of lactation day 6 (L6) vs. milk of lactation day 15 (L15). The dashed line indicates the theoretical level of random orientation. Wilcoxon's tests: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. The central square within the box is the median; the box encloses the interquartile range; whiskers show 1.5 times the interquartile range, "o" indicate outliers.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The present study showed first that mouse pups of any age can detect the odor of conspecific milk, and that they are attracted to it against water regardless of the lactation stage of the donor female. This confirms previous work on the salience of murine milk for mouse pups (see sections II.1 and II.2), and extends the pan-mammalian phenomenon of neonatal attraction toward the odor of conspecific milk (e.g., Coureaud et al., 2001; Keil et al., 1990; Marlier & Schaal, 2005; Mizuno & Ueda, 2004; Schaal et al., 2003; reviewed in Schaal, 2010).

But the most significant result pertains to the neonates' relative response to the odor of milk samples collected at different lactation stages. Although all milk odors proved attractive in the absolute preference tests, some were more attractive than others in relative tests. These tests

revealed that pups aged 6 days or below display reduced attraction to the odor of milk collected somewhere after postpartum days 6. Such a developmental shift in responsiveness may be explained either by lactation stage-related variations in the odor properties of milk, by variations in chemosensory abilities of mouse pups, or by both.

Regarding lactation stage-related variations in milk odor, we are unaware of any study that has analyzed milk composition changes along lactation in terms of odor or flavor correlates in the mouse. But numerous studies point to lactation stage-related composition changes of murine milk in terms of macronutrients and bioactive constituents. For example, lipid composition is altered between L3 and L14 (Görs et al., 2009; Knight et al., 1986; Ragueneau, 1987), lactose augments until L18 (Görs et al., 2009), ϵ - and α S1-casein increase from early (L0-L2) to mid/late (L8-18) lactation (Rijnkels et al., 1997; Riley et al., 2006; Yoneda et al., 2001), while the epidermal growth factor peaks around L6 and decreases at L12 (Grueters et al., 1985). Lactational changes in milk composition are obviously more extensively documented in other species, namely humans and dairy animals (Jensen, 1995), and demonstrate species-specific developmental patterns of milk composition.

Whether and how such developmental patterns of milk composition correlate with milk odor profiles is so far unknown. Several processes translating milk composition into odor cues may be effective separately or conjointly. First, the milk content in odor-active compounds or in odor precursors may change along lactation. One such case is noted in the rabbit, in which a milk compound with high odor impact, the mammary pheromone 2-methylbut-2-enal, is significantly more concentrated in early (L3) than in late (L23) milk (Coureaud et al., 2006b). Second, changes in the odor-binding properties of milk may alter the profile of hydrophobic or hydrophilic volatiles. For example, minute variations in fat or protein content in a milk-based mixture notably affect the release of aroma compounds (Druaux & Voilley, 1997; Hansen, 1997; Miettinen et al., 2004). Finally, there is evidence that newborn mammals can actually detect odor correlates of changing milk composition, namely during the transition between colostrum and transitional milk (Marlier et al., 1997; Schaal, 2005). In sum, biochemical variations in milk might be olfactorily detected by offspring, adding communication to the recognized functions of milk that include hydration, nutrition, immunoprotection, endocrine control, and nonpathogenic bacterial transfer (Bernt & Walker, 1999; Nusser & Frawley, 2001; Peaker, 1998; Schaal, 2005; 2010).

Some concern might be raised about possible consequences on milk odor of the milking procedure used here which implied anesthetizing donor females and boosting their milk ejection by oxytocin (as recommended by murine milk experts; DePeters & Hovey, 2009; Devinoy et al., 1995). Some studies demonstrated that oxytocin, xylazine and ketamine are potentially transferred into milk in dairy species (Allen, 1990; Gorewit & Sagi, 1984; Hameed et al., 2010; Putter & Sagner, 1973; Sellers et al., 2010). However, as the same, low doses of these agents were used in all females, we consider this potential influence to be controlled across groups. This is further supported by the fact that all milk gave off odors that were attractive against water to pups of any age, and that were differentially attractive when tested between milk.

As regards age-dependent variations in chemosensory abilities of mouse pups, the youngest mice (P2, P6) approached more the odor of milk collected in earlier (L2, L6) than in later lactation (L15). Thus, L2-L6 milk may bear similar volatile profiles, which may then alter in L15 milk. P2 pups could not learn the odor of L6 milk, although compounds from L2 milk may occur in L6 milk. Similarly, P6 mice were familiarized to both early (L2, L6) milk, but not to the supposedly novel L15 milk. Learning is more evident in P15 mice that were attracted to any milk odor. Their indiscriminant responses may be due to reduced selectivity to milk odor variations either: 1) because they have already recorded beneficial consequences with all of them, or 2) because they were more susceptible to pre-test nursing deprivation leading to a higher hunger state. However, this latter possibility is mitigated by the fact that pups of all ages displayed similar levels of attraction to milk odor in the absolute tests. In sum, the present data can be interpreted in terms of exposure and learning effects which increase with age. However, for the youngest pups (P2-P6), interpretations based on fetal exposure and/or on predisposed stimulus-response coupling for some milk compounds cannot be excluded.

How do the four predictions outlined in the Introduction accommodate with the present data? The first proposal was that behaviorally-active odorants might be predominantly emitted during early lactation when neonates face maximal survival challenges. Illustrated in the rabbit (cf. above; Coureaud et al., 2006b; Schaal et al., 2003), a similar process might be involved in the responses of P2 and P6 mice in their greater attraction to the odor of early-lactation milk. A second adaptive mechanism posited that neonates could express a “bias” or an “expectation” in favor of the odor profile of age-matched milk. Although unrelated with milk, a remarkable case of female chemoemission-offspring chemoreception synchrony was

shown in the rat: dams begin emitting unidentified odor agents in their soft feces at P14, a time when their pups precisely begin reacting to them, and by P28 they cease emitting this compound when the pups reduce responding to cæcotrophes (Moltz & Lee, 1983). Coming back to mammary function, such a matching process between milk odor and offspring chemosensory proclivities was shown in the rabbit (cf. above Coureaud et al., 2006b) and the rat. Rats aged 12 h to 10 days grasp indeed more rapidly the nipples of a female whose lactation stage is aligned with that of their own mother than the nipples of females whose lactation age differed from their own mothers' by at least 7 days (Holloway et al., 1978). Recent evidence from the rat shows that a small subset of olfactory receptor genes are expressed or overexpressed at birth, suggesting the possibility of specialized odor reception mechanisms in relation with the mother or milk (Rimbault et al., 2009). The third prediction assumed that mouse pups would prefer any milk collected from females that are in the same or preceding lactational stages than that of their own mother because corresponding odor profiles could be learned (Armstrong et al., 2006; Bouslama et al., 2005; Durand et al., 2003; Mainardi et al., 1965). This is clearly verified here in P15 (for L2, L6, and L15 milk odors) and in P6 mouse pups (for L2 and L6 milk odors). Finally, it was predicted that mouse pups would accept any murine milk in the context of the communal nursing regimen typical of *Mus musculus* (Branchi, 2009; König, 1994; Weber & Olsson, 2008). This prediction might not hold for P2 and P6 pups when confronted with two females differing in lactational age (assuming that lactation stage-dependent differences in milk odor co-vary with odor contrasts on the females' ventrum and nipples; cf. Holloway et al., 1978). These latter pups behaved indeed differentially in the relative attraction tests as a function of lactation stage. However, P15 pups appeared less selective in such conditions and might therefore take advantage of any lactating female in a communal nursing context. If the discrimination towards milk odors of differing lactational ages extends to the body odor of lactating females, one may predict that young pups will behave more discriminately toward allied females in the communal nursing situation than older young. This needs to be ascertained, however.

To conclude, mouse neonates are differentially attracted to milk from different lactational stages, when milk odors are presented in relative attraction tests. The selective response is clearest when cumulative exposure to milk is minimal, younger mice being more attracted to milk that are matched or nearly-matched to the lactational stage of their own mother. At later ages, with expanding energetic needs and autonomy in foraging, mouse pups develop more opportunistic responses and their attraction to milk odor seems blurred by learning and

generalization. In a broader view, these results highlight a possible temporal coordination in the interactions between maternal lactation physiology and neonatal perception and behavior. They raise issues about the feeding of neonates born at atypical timing (viz., premature infants), and whose initial adaptation and growth might be optimized when given age-adapted milk. Although no chemosensory preference data are at hand as yet in these infants, there is evidence for more optimal development when they are fed own mothers' milk (Atkinson et al., 1981; Heiman & Schanler, 2006; Schanler, 2011), which certainly is the most timely for them.

1.3) Conclusion

Ce travail avait pour objectif d'étudier la dynamique temporelle du pouvoir attractif du lait murin en évaluant les préférences de souriceaux de différents âges pour des laits prélevés sur des femelles de différents âges lactationnels. Les résultats globaux montrent que : 1) tous les laits, quelle que soit la période de lactation, émettent une odeur attractive pour les souriceaux de 2, 6 et 15 jours; 2) les souriceaux P2 et P6 préfèrent toutefois explorer l'odeur d'un lait de 2 et 6 jour que celle d'un lait prélevé au 15^{ème} jour de lactation ; 3) les souriceaux P15 n'expriment pas de préférence envers les laits extraits aux trois différentes périodes de la lactation testées.

Nous pouvons conclure que le lait murin présente des propriétés chimiosensorielles différentes à ces stades de lactation, et que ces propriétés pourraient refléter des fluctuations biochimiques du lait (Görs et al., 2009; Grueters et al., 1985 ; Knight et al., 1986; Ragueneau, 1987 ; Rijnkels et al., 1997 ; Riley et al., 2006 ; Yoneda et al., 2001). Deux mécanismes sont susceptibles d'expliquer les réponses différentielles obtenues aux trois âges testés: 1) Les souriceaux seraient plus attirés par des laits auxquels ils ont été confrontés par rapport à des laits d'âges plus avancés (donc non familiers); 2) les souriceaux d'âges précoces (P2-P6) seraient attirés par des laits de leur âge (plus ou moins appareillés à l'âge lactationnel de leur mère) tandis que les souriceaux plus âgés (P15) seraient plus opportunistes du fait de leurs besoins nutritionnels accrus, et développeraient des réponses généralistes envers tous les laits.

Des expériences complémentaires ont été réalisées et sont décrites dans l'Annexe 4.

2) SELECTIVITE DES SOURICEAUX A LA NAISSANCE FACE AUX ODEURS DE LAITS D'AGES LACTATIONNELS DIFFERENTS

2.1) Introduction

L'étude précédente a mis en évidence des réponses discriminatives à l'égard des laits de différents âges lactationnels chez les souriceaux. Ces résultats suggèrent que le profil olfactif du lait change entre les 2-6^{ème} jours et le 15^{ème} jour de lactation, que les souriceaux les plus jeunes détectent ce changement et préfèrent les odeurs de laits d'âges précoces L2-L6 par rapport à L15.

Ce résultat nous amène à préciser le phénomène en présence en élargissant la fenêtre des âges testés, aussi bien au niveau des laits que des souriceaux. Une période de la lactation présente à ce titre des propriétés compositionnelles très particulières et donc intéressantes à aborder: La période colostrale. Du fait de la présence d'éléments nutritifs, immunologiques, hormonaux et endocriniens, le colostrum est impliqué dans la croissance neurale et intestinale, la protection contre l'infection et l'inflammation, la régulation de l'éveil néonatal et les apprentissages (Ellis & Picciano, 1992; Georgiev, 2008; Jensen, 1995; Schaal, 2010).

Afin de compléter nos précédents résultats et de préciser les mécanismes perceptifs des souriceaux et chimiques du lait, nous testerons ici les réponses préférentielles de nouveau-nés à la naissance (avant et après la première tétée) à l'égard de l'odeur de laits prélevés à différents âges lactationnels.

2.2) The initial response of newly born mice to the odors of murine colostrum and milk: Unconditionally attractive, but conditionally discriminated ⁶

Syrina Al Ain, Mathieu Mingioni, Bruno Patris, Benoist Schaal

ABSTRACT

Milk conveys chemosensory cues that are attractive to mammalian neonates. However, the potency of milk odor varies along lactation. This study investigated whether olfactory fluctuations in milk during lactation are detected by newborn mice (*Mus musculus*, BALB/c strain). Pups differing in early suckling experience were exposed to the odor of milks sampled from females varying in lactational stage. Immediately after birth, suckling-inexperienced (P0) and suckling-experienced pups (P0+) were assayed in a series of paired-choice tests contrasting murine milk [of lactation days 0, 3, 15 (noted L0, L3, L15, respectively)] and a blank stimulus (water) to evaluate olfactory detection of milk odor. Preference tests also contrasted two milk collected at these differing lactation stages to assess their relative attractiveness. Results showed first that P0 and P0+ detected and reacted by positive orientation to any milk odor. When L0 milk was presented against L15 milk, P0 pups oriented for a similar duration towards these odor stimuli, whereas P0+ pups spent more time toward the odor of L0 than of L15 milk. Finally, P0+ pups oriented similarly to odors of milk collected from nipples that were suckled or never suckled (L0+ and L0, respectively), but odors of L0 milk were more attractive than that of L3 milk. It is concluded that murine milk conveys odor compounds which behavioral activity fluctuates as a function of lactational stage of the female and of pup suckling experience.

Keywords: Newborn; Olfaction; Colostrum; Milk; Sucking; Lactation; Laboratory mouse (*Mus musculus*)

Running Head: Attraction for colostrum in mouse newborns

⁶ Article en préparation

INTRODUCTION

The perinatal period is a complex, and probably the most delicate, stage in an organism's life. The mammalian transition from fetus to newborn goes indeed with multiple physiological, cognitive and behavioral transformations, ensuring neonatal survival and orienting the organism's developmental career. The sudden change from the fetal environment - providing warmth, hydration, and nutrition - to the cold, dry and potentially hostile postnatal environment, constrains newborns to compensate as immediately as possible for the loss of passive perfusion of matters by the mother. From now on, newborns have to be active in seeking shelter, warmth, water and energy, which are all best achieved in contacting the mother, localizing her mammae and incorporating her milk (Alberts, 1987; Schaal, 2010). Newly born mammals are aided in such initial tracking for the mother and milk by a range of sensory cues she emits, and especially by odor cues stemming from the mammary area and lacteal fluids (e.g., Blass, 1990; Rosenblatt, 1983; Schaal 2005, 2010). But the periparturitional period is a transitional time characterized by considerable fluctuations in the mother's hormonal and physiological states (e.g., Rosenblatt & Snowdon, 1996), and in infants' adaptive responses to their new life circumstances (e.g., Stawe, 1978). Thus, the system of sensory cues that infants use to approach the mother and her nipples may change accordingly, either in availability as lactation progresses or in saliency as offspring grow and learn.

Even the main source of neonatal sustenance evolved by mammals – milk – varies dramatically. Its composition and yield change along lactation, mirroring fluctuating demand of offspring and maturation of lactational physiology in the female. These changes were documented in terms of macro/micronutrients and bioactive compounds (German et al., 2002; Hamosh, 2001; Jensen, 1995) and several stages of lactation have been identified accordingly (*i.e.*, the precolostral phase, beginning in late pregnancy, the colostrum phase, starting from birth to the beginning of lactogenesis, the transitional phase, setting on at lactogenesis until the mature phase). These lactational stages do vary among species in timing and duration [e.g., the transitional phase begins on 4 h prepartum in the rat, at parturition in the cow, on postpartum days 3-5 in humans (Hartmann, 1973; Neville, 1995; Neville et al., 2001; Tovar et al., 2001)], but the compositional contrast between colostrum and subsequent milk seems the sharpest and the most ubiquitous across taxa (Baintner, 2007; Davis et al., 1994; Georgiev, 2008; Jensen, 1995; Ontsouka et al., 2003; Salimei et al., 2002).

Little is understood on whether newborns sensorily detect lactation stage-specific fluctuations in milk composition. What is currently known is that mammalian newborns do detect the sensory qualities of milk in general, as they are attracted to it olfactorily and display appetite to its aroma, taste or texture (Schaal, 2010). For example, human infants react to subtle changes in milk flavor when the mothers “import” novel aromas through her diet (Mennella & Beauchamp, 1991), and neonatal avidity of suckling behavior along the nursing episode has been related to the lipid/protein content of milk (Hall, 1975, but see Drewett, 1982; Nysenbaum & Smart, 1982). Otherwise, rabbit newborns exhibit much stronger appetitive responses to the odor of milk produced during the first week postpartum than to the odor of milk preceding weaning (Coureaud et al., 2008; Keil et al., 1990).

In the present study, we aim testing whether neonate mammals can detect and discriminate chemosensory cues from lacteal secretions collected at different stages of lactation. We assessed this ability in the mouse for four motives: 1/ murine milk was shown to convey odor-active compounds which elicit positive orientation and promote nipple grasping in mouse pups (see sections II.1, II.2; Logan et al., 2012). 2/ Compositional fluctuations of milk along lactation have been described in the mouse, although mostly for macro/micronutrients (Görs et al., 2009; Knight et al., 1986; Ragueneau, 1987; Richards & Beardmore, 1984; Sun et al., 2002). 3/ We have recently shown that mouse pups on postnatal days 2 to 6 (P2-P6) differentiate milk from early (L2-L6) versus late lactation (L15) by their odor (see section III.1). Finally, 4/ in the wild, as well as in laboratory conditions when it is made possible, mouse females nurse their litters communally (König, 1994; Manning et al., 1995; Sayler & Salmon, 1971; Wilkinson & Baker, 1988). Therefore, their pups can effectively be exposed to choose between females in different lactational stages. Thus, as a first step before undertaking chemical analyses, we will consider mouse pups' reactions to the odor of different milk as a proxy to underlying chemical changes in milk along lactation. If the chemosensory profile of milk co-varies with its biochemical composition, then it is not unreasonable to expect that chemosensory processes in neonatal mice may have been selected to induce preference for the milk which is best adapted for species-typical development.

So far, mouse pups have been assayed for milk odors after more or less extensive experience of nursing, and hence repeated opportunities to learn. We will turn here to the earliest responses of mouse pups to murine milk odor in an attempt to cover the short time-window when the change from colostrum to milk occurs. We focused on these lactational ages because several studies reported that murine milk composition changes abruptly during the first days

after parturition (Knight et al., 1986; Riley et al., 2006; Yoneda et al., 2001). However, what is defined as colostrum in the mouse literature is not fully obvious. Although several authors agreed that mice produce a lacteal fluid named colostrum at least during the first 24 hours postpartum (e.g., Green, 1983; Yoneda et al., 2001), there is no operational definition based on compositional or organoleptic criteria. In general, colostrum is defined as the mammary fluid secreted during the last days of pregnancy and in the first few hours/days (depending on species) following birth (Langer, 2009). It affords hydration, energy and essential nutrients (*i.e.*, proteins, fats, lactose, essential fatty acids and amino acids) for initial neonatal survival. But the distinctive feature of colostrum is that it also carries a range of bioactive compounds (enzymes, hormones, growth factors, nucleotides, antioxidants, cytokines, and immunological agents) involved in neural and gut growth, protection against infections and allergies, and regulation of arousal and learning (Ellis & Picciano, 1992; Georgiev, 2008; Jensen, 1995; Schaal, 2010). Colostrum also conveys chemosensory elements that inform the neonatal brain about odor/taste similarities between previous and current ecologies (amniotic fluid vs. colostrum, colostrum of day of birth vs. colostrum of day 1, etc.) (*e.g.*, Marlier et al., 1997, 1998). But, despite a name that fosters an illusion of homogeneity, colostrum is transitory and its content is in a state of rapid flux: it changes from one hour/day to the next to progress toward “mature” milk after the onset of lactogenesis. Such change is visually obvious in its color alterations due to decreasing concentrations in carotenoids (Patton et al., 1990).

The effect of initial suckling experience on responsiveness to colostrum and milk odor will be assessed in three experiments. They will consist in exposing pups on the day of birth (noted P0), before and after they suckled for the first time (the groups of pups will be noted P0 and P0+, respectively), to the odors of colostrum (L0) or milk collected in later lactation, on postpartum days 3 and 15 (noted L3 and L15, respectively). These experiments intend to test whether newly born mice: 1/ do olfactorily detect colostrum/milk, and are attracted by them, 2/ differentiate colostrum from late-lactation milk, and 3/ perceive colostrum/milk odor differently as a function of their very initial suckling experience. Although subsidiary, a fourth aim was to verify whether pups label nipples when they first suckle, either in depositing oro-labial substrates or in favoring bacterial colonization on their surface, and whether such a label could be entrained into milk at collection.

We hypothesized that the colostrum period might carry stronger olfactory potency for newborns than late-lactation milk (L15), as already shown in P2-P6 pups (section III.1), but perhaps also than milk produced earlier (L3). At this early developmental stage, the strategy

of producing a highly reinforcing milk secretion may indeed provide an adaptive kick-off to newly born pups, when their metabolic, immunological, and neurodevelopmental needs are maximal to survive. Further, in line with theorizing with the highly adaptive value of neonatal learning (Alberts, 1987; Brumley & Robinson, 2010), we assume that the initial suckling experience should rapidly enhance odor-based preferential responses toward the colostrum.

GENERAL METHODS

Animals and Housing Conditions

Female and male mice (*Mus musculus*, BALB/c strain, purchased at Charles River, L'Arbresle, France) were housed together with their litter in standard Plexiglas boxes (28 x 17 x 13 cm). Males were left with females to ensure impregnation at postpartum estrous. The animals were set under constant conditions of lighting (12:12 h, light on at 7h30), temperature (20-22°C), and diet (SAFE, Augy, France) throughout the pregnancy and lactation periods. Pellets were made of wheat, corn, wheat bran, barley, extruded soya seeds, soya meal, condensed fish soluble, yeast, calcium carbonate, dicalcium phosphate, vitamin (vitamin A, E and D3) and oligoelement premixes, to result in a diet composed of 21.4% crude protein, 5.1% crude fat, 5.7% crude ash (mineral material) and 4% crude fibers. Pellets and water were provided *ad libitum*. French national and local rules concerning the use of laboratory animals were strictly followed (authorization no. 21 CAE 059). The number of pups by litter was culled to 8 maximum to standardize pup competition at nursing.

Test Animals

We tested 211 mouse pups on the day of birth, which were distributed into two experimental groups as a function of age and suckling experience. A first group was composed of pups aged 4-6 hours (mean: 5.49 hours; SD=1.06 hours) and were devoid of any suckling experience (Group P0). In the second group, the pups were 8-15 hours old (mean: 11.16 hours; SD=1.98 hours) and had suckling experience (Group P0+). For the P0 group, an experimenter watched the spontaneous delivery and separated the mother from the litter just after she completed placentophagia and licking of amniotic fluid on pups, but before pups could engage suckling. In the P0+ group, the pups were separated from the mother after 4-to-11 hours of suckling experience and milk could then be seen in their stomach by transparency through the abdominal skin. Both of these groups of pups were devised to assess whether

early exposure to nursing and milk during initial suckling experience would be enough to establish learning of related odor cues. To prevent litter effects, at most 5 pups of a same litter were tested in a same experiment.

To maximize their motivation to respond to maternal stimuli, the pups were deprived of contact with the mother and, hence, of suckling, for 4 h prior behavioral testing. The 4-h period of pup separation from the mother was modeled after previous studies in the mouse (sections II.1, II.2 et III.1; Armstrong et al., 2006; Durand et al., 2003) and in the rat (Hall et al., 1977; Hofer et al., 1976) indicating both an absence of jeopardy and its efficacy in improving neonatal motivation. The potential effects of social stress and hypothermia during this separation period from the mother were limited by letting the fathers with the litters and putting the breeding boxes on a heating plate (28 x 20 cm; Gestigkeit, Düsseldorf, Germany) set at 40°C. Hence, temperature inside the nest was maintained at 37°C.

Stimuli

Different types of fresh milk were obtained from recently parturient females (LF) at the following stages of lactation (**Figure 23**): **1**) 2-4 h postpartum colostrum (L0), collected just after delivery from 41 LF which have never been suckled (cf. 'Test Animal' section), **2**) 8-15 h postpartum colostrum (L0+) from 27 LF which have been shortly suckled, **3**) milk collected from 12 LF at the 3rd day of lactation (L3), and **4**) milk collected from 27 LF at the 15th day of lactation (L15). We focused on these lactational ages because several studies reported that murine milk composition changes abruptly during the first days after parturition and between weeks 1 and 2 (Green, 1983; Görs et al., 2009; Knight et al., 1986; Ragueneau, 1987; Richards & Beardmore, 1984; Sun et al., 2002; Yoneda et al., 2001), leading to compare pup responses to milk odor during the first days (L0 vs. L0+ and L0 vs. L3 comparisons) and between the first day postpartum and the second week (L0 vs. L15 comparison). In addition, we observed subtle color differences, particularly between yellowish L0 milk from 2-4 h postpartum and white L3 milk, suggesting that milk composition and perhaps sensory properties may change accordingly.

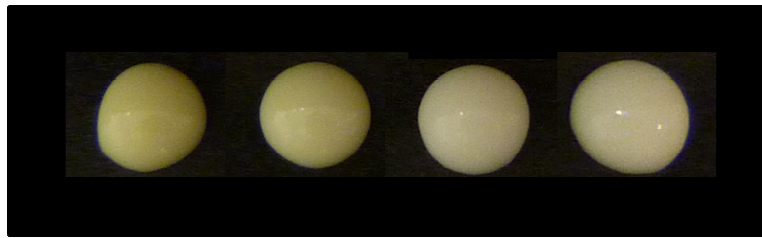


Figure 23. Fresh murine colostrum/milk collected on different lactation stages (from left to right): colostrum collected at 2-4 h postpartum from nipples which have never been suckled (L0), colostrum collected at 8-15 h postpartum from nipples which have been shortly suckled (L0+), milk from postpartum day 3 (L3), and milk from postpartum day 15 (L15).

The procedure of milking consisted first in separating the lactating females from their litter for 2 h before being anaesthetized by an intra-peritoneal injection of a mixture of ketamine (Imalgène 1000, Vibrac, France; 69 mg/kg body weight) and xylazine (Rompun 2%, Bayer, Puteaux, France; 13.8 mg/kg body weight). The females were then injected intraperitoneally with 0.15 mL of oxytocin (Intervet, Unterschleissheim, Germany) and their nipples gently massaged to stimulate milk let-down. Each nipple was suctioned with a glass Pasteur pipette to obtain fresh milk. In total, the milking procedure lasted 15-20 min during which 0.5 to 1 mL of milk was collected and aliquoted into glass vessels kept on ice. The fresh milk was immediately used for the tests. It is important to note that pups were never tested with the milk of their own mother. The control stimulus consisted in water.

Test device and procedure

Device

The test consisted in a differential head-orientation assay (adapted from Hepper, 1988; **Figure 24**) where cephalic bilateral motor actions of the pups were quantified. To prevent thermoregulatory stress of the pups, all tests were performed on a heating plate (temperature set at 32°C). A blotting paper (Tork Universal Wiper 310 Centrefeed Roll, Gothenburg, Sweden) was taped on the heating plate. A midline drawn on the blotting paper delimited two equidistant areas. Two auto-adhesive labels (0.8 x 1.2 cm; ApliI Paper S.A., Barcelona, Spain) were stuck bilaterally at 2 mm of this midline (**Figure 24**). Five µL of stimulus were applied on both labels by an experimenter A using a micropipette. The blotting paper and both labels were changed after every test.

Procedure and dependent variable

The behavioral testing was carried out in a room adjacent to the breeding room to avoid potential interference with unplanned olfactory stimulations from other mice. The pup to be tested was gently pinched by its interscapular skin between gloved thumb and forefinger, and approached from both stimuli for 6 s. The presenting experimenter B was blind as to the lateral position of the stimuli. This pre-test phase, used in studies on other mammalian newborns (Macfarlane, 1975; Schaal et al., 1995a), intended giving the pup controlled exposure with each stimulus prior the choice test. The order of this odor pre-presentation was counterbalanced within groups. The 3-minute test began when a pup was deposited with its midline aligned with the midline of the device. It was videotaped to be later analyzed for the differential duration of pup orientation toward each of the paired stimuli. Analyses were made using the Observer software (Noldus, Wageningen, the Netherlands) that allowed to assess behaviour frame by frame to precisely record the timing of the pups' bilateral orientation responses. A pup was considered to be oriented toward one stimulus, when both of its nostrils crossed the midline toward that stimulus. A pup that did not orient to both odor stimuli during the test was excluded from analyses. The coder was blind regarding the nature and lateral position of stimuli.



Figure 24. Cephalic orientation test used for mouse pups on the day of birth.

Test conditions

In Experiment 1, we evaluated first whether the odor of L0 and L15 milks are detected by P0 pups against the control stimulus. The tests consisted in exposing P0 pups to either L0 milk (n tested/n analyzed =22/19, from 5 litters) or L15 milk (n=15/15, from 5 litters) against water. Secondly, in simultaneously opposing L0 and L15 milks we assessed whether they would

convey differential attractiveness for suckling-inexperienced P0 pups (n=30/28, from 8 litters).

Experiment 2 intended to evaluate the involvement of suckling experience in the initiation of odor-guided behaviors. The same test conditions were thus run on suckling-experienced P0+ pups, including: 1) L0 milk against water (n tested/n analyzed =20/18, from 7 litters), 2) L15 milk against water (n=23/20, from 5 litters), and 3) L0 milk against L15 milk (n=37/32, from 9 litters).

Experiment 3 gauged whether L0 milk odor is differentiated by newborn mice from milk taken when lactation is established. Specifically, we examined whether P0+ pups, could differentiate odor cues from L0 milk (taken from nipples which have never been suckled) and those from L0+ milk (collected from nipples that have been shortly suckled) or from L3 milk. First, we verified the differential attractive power of L0+ and L3 milk odors in absolute tests opposing them with water [L0+ milk vs. water (n tested/n analyzed =20/18; from 8 litters); L3 milk vs. water (n=25/19, from 6 litters)]. Then, two relative preference tests opposed 1/ L0 against L0+ milk (n=23/21, from 5 litters), and 2/ L0 against L3 milk (n=23/20, from 6 litters).

Statistical Analyses

Kolmogorov-Smirnov tests indicating normal distribution of data in the groups, parametric statistics were used (Statistica 8, Statsoft, Paris, France). The pups' side preference were assessed using Student's one-sample *t*-tests, comparing the observed cumulated duration spent oriented to one half of the device with the theoretical duration if the animal would have oriented at random (*i.e.*, 90 s). Kruskal-Wallis tests showed no significant litter effects ($1.125 < H < 6.100$, in all cases $p > 0.05$) and no significant milk donor effects in any group ($2.194 < H < 9.369$, in all cases $p > 0.05$).

RESULTS

Experiment 1. Response of P0 suckling-inexperienced newborns to L0 colostrum vs. L15 late-lactation milk

As shown in **Figure 25A**, P0 pups spent significantly longer time oriented to the odors of L0 and L15 milk than to water (L0: $t=4.293$, $p<0.001$; L15: $t=3.165$, $p=0.007$; respectively). In

tests pairing the odors of L0 and L15 milk, P0 pups appeared to orient equivalently to both stimuli ($t=0.161$; $p=0.874$). In sum, P0 pups are able to detect the odors of both L0 and L15 milk, and display attraction to them against water. However, when presented simultaneously, the odors of L0 and L15 milk are treated as behaviorally equivalent by P0 mice pups.

Experiment 2. Response of P0+ suckling-experienced newborns to L0 colostrum vs. L15 late-lactation milk

This experiment was intended to evaluate the effect of the first suckling experience on initiation odor-guided behaviors of pups on the day of birth (**Figure 25B**). First, when exposed to the odors of either L0 and L15 milk against water, P0+ pups oriented significantly longer to either milk (L0: $t=4.534$, $p<0.001$; L15: $t=2.675$, $p=0.015$; respectively), indicating that these odors are attractive to them. Second, when the L0 and L15 milk odors were simultaneously presented to P0+ pups, they oriented significantly longer to the former than to the latter ($t=2.265$; $p=0.031$). Thus, P0+ pups show more attractiveness the odor of L0 milk than to that of L15 milk, and indicate a change in either the discriminative ability of pups or in the odor of milk between lactation days 0 and 15.

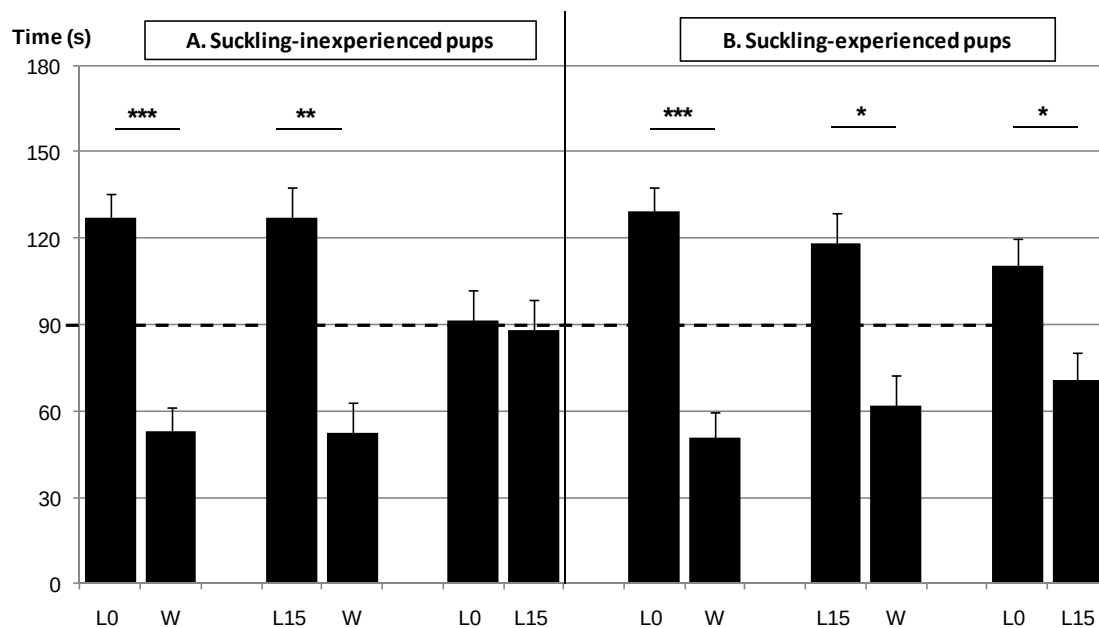


Figure 25. Mean duration ($\pm$ SE, in sec.) mouse pups differing in suckling experience on postnatal day 0 (P0) spent oriented to either stimuli in paired choice tests assessing absolute (milk vs. water) or relative attraction (milk vs. milk). A) Suckling-inexperienced pups' orientation when facing L0 milk (L0) vs. water (W), L15 milk vs. water, and L0 vs. L15 milk. B) Suckling-experienced pups' orientation in the same paired-choice tests. Student's t tests: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Dashed line: level of random orientation duration.

Experiment 3. Response of P0+ suckling-experienced pups to L0 vs. L0+ colostrums, and L0 vs. L3 late-lactation milk

Experiment 2 indicates that milk volatiles differ between ages P0 and P15 for suckling-experienced (P0+) pups. Here, we investigated first whether P0+ pups are able to olfactorily discriminate between milk collected in a more restricted time window following birth. We verified first whether the first suckling episode can affect the odor cuing properties of the milk collected subsequently. Thus, colostrum ejected from nipples which have never been suckled (L0) is contrasted with colostrum from nipples that were suckled for several hours (L0+) by other P0 pups. Second, odors of colostrum (L0, from pre-suckled nipples) and of L3 milk were contrasted in the paired-choice test.

P0+ pups oriented their muzzle significantly longer to both L0+ and L3 milks odors when presented against water (L0+: $t=2.125$, $p=0.049$; L3: $t=2.601$; $p=0.018$; **Figure 26**). L0 milk odor having been shown attractive in Experiment 2, all three milk substrates can be considered to release behaviorally active odorants for newborn pups. In the test opposing the colostrum extracted from non-suckled (L0) or suckled (L0+) nipples, P0+ pups turned equivalently to both stimuli ($t=-0.201$; $p=0.842$). Finally, when exposed to the odors of L0 and L3 milk, P0+ pups oriented significantly longer to the former than to the latter ($t=2.909$; $p=0.009$). In sum, suckling-experienced P0+ pups react differentially to the odors of lacteal secretions differing in lactational age (L0 vs. L3 milk), but not to such secretions collected from nipples differing only in suckling status (L0 vs. L0+).

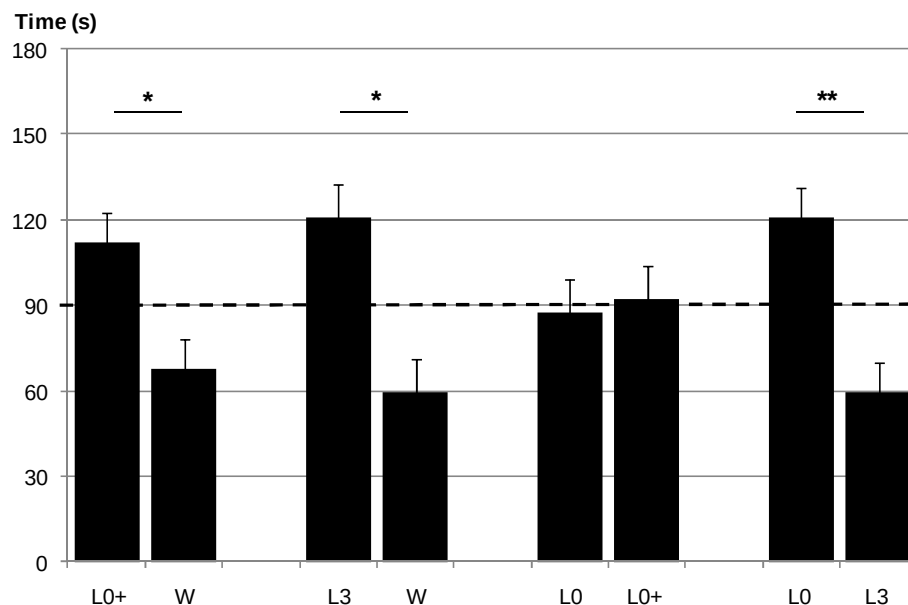


Figure 26. Mean time ($\pm$ SE, in sec.) that newly born, suckling-experienced pups (P0+) spent oriented to either stimuli opposed in four paired-choice tests (from left to right): Colostrum from suckled nipples (L0+) vs. water (W); milk from postpartum day 3 (L3) vs. W; Colostrum from unsuckled nipples (L0) vs. L0+; L0 vs. L3. Student's t tests, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. Dashed line: level of random orientation duration.

DISCUSSION

The present study aimed to assess first whether colostrum conveys odor compounds bearing higher behavioral activity than late-lactation milk for newly born mice assayed several hours post-birth, and second whether previous suckling experience does affect the pups' perception of these bioactive compounds. When presented behavioral assays contrasting a milk odor against water, newly born mouse pups respond as if any *fresh* murine milk conveys attractive odor stimuli. This result corroborates previous studies (sections II.1, II.2 and III.1; and partially, Logan et al., 2012). Here, we show additionally that this positive orientation toward murine milk is unconditional of previous exposure to such milk in a very first suckling episode: suckling-naïve P0 pups oriented indeed indiscriminately toward the odors of colostrum (L0) and late-lactation milk (L15) (Experiment 1). However, the first suckling experience enhances the pups' discriminative competence, a suckling-experienced P0+ pups turned their muzzle more to L0 milk odor than to L15 milk odor (Experiment 2). Moreover, Experiment 3 indicates that suckling-experienced P0+ pups can discriminate also the odors of milk collected within a much narrower time-window of lactation, viz. L0 colostrum and early-lactation milk (L3). Thus, after a very early exposure to suckling, pups become keener discriminators and show a clear preference for the odor of milk that is best matched in lactational stage with their age. This result also confirms previous findings on the relative synchrony in the odor of milk effluvium and neonatal chemosensation in the mouse (see section III.1).

Chemosensory fluctuations of murine milk

Fluctuations in the odor properties of murine milk along these lactation periods may be partially underlain by variations in its biochemical composition along the process of lactation. For example: 1/ lactose concentration increases dramatically between lactation days 3 and 18 (Görs et al., 2009); 2/ caseins are variably expressed between days 0 (colostrum) and 8 (late lactation), with higher contents in β - and κ -caseins and lower content of α -casein (Yoneda et al., 2001). Further, ϵ - and α S1-casein expression level increases from early (L2) to late lactation (L10-L18), and three peptides derived from α - and γ -caseins appear to be colostrum-specific (Rijnkels et al., 1997; Riley et al., 2006); 3/ epidermal growth factors peak on postpartum day 6 and then decline from day 12 (Grueters et al., 1985); 4/ L-Amino acid oxidase expression level increases 1 day before parturition, peaks in early lactation, and decreases close to weaning (Sun et al., 2002); 5/ fat increases from lactation day 2 to 10-11,

and then stays high until days 17-18 (Görs, et al., 2009; Knight et al., 1986; Silverman et al., 1992). The chemosensory correlates of these biochemical changes are so far unknown, but evidence based on model dairy matrixes indicate that minute variations in lipid, protein or hydrocarbon contents can make great differences in the release of aroma compounds in the headspace (e.g., Druaux & Voilley, 1997; Hansen, 1997; Miettinen et al., 2004).

To our knowledge, no study has attempted to delineate the nature and range of volatiles that are released in the headspace of milk all along lactation in the mouse (or in any mammal). Studies targeting single volatiles in the headspace developing over milk attest that such changes do occur during lactation in the rabbit (e.g., Coureaud et al., 2006b) and encourage further analyses to characterize the chemical correlates and the functional meaning of the above hypothetical periods in murine lactation in terms of female-offspring communication. The proposed lactational sequence may orient sampling and comparative chemical analyses of milk in such future studies.

Newly born pups' attraction of, and discrimination between, different milk odors

Neonatal attraction of different milk odors

Regarding the olfactory attractiveness of milk, our findings in the current and previous studies (see sections II.2 and III.1) are partly concordant with a recent comprehensive investigation by Logan et al. (2012). These authors applied an experimental preparation that differs from ours in an attempt to characterize the odor-active substrates that elicit initial nipple seizing/sucking in newborn mice. Coating odor-neutralized nipples with amniotic fluid, milk or maternal saliva reinstated indeed the typical sucking response, thus corroborating our own results (see section II.2). In an attempt to control for exposure effects potentially explaining this result (the pups were aged <12 h and, hence, had a chance to experience all these stimuli while suckling), Logan et al. assayed pups delivered by C-section and deprived of suckling experience prior to testing. When facing nipples coated with amniotic fluid, maternal saliva, colostrum or milk, these “odor-naïve” pups only attached to the nipples painted with amniotic odor, suggesting that the behavioral activity of the other substrates – specifically colostrum and milk – was conditional upon previous exposure in the postnatal environment. Here, Logan et al.'s and our present findings appear somehow divergent. In Logan et al.'s conditions, colostrum and milk were not effective to trigger oral grasping/sucking of a nipple right after birth in absence of any exposure to these fluids through prior suckling. In contrast, in our own

conditions, unsuckled newly born pups displayed positive attraction toward colostrum and later-lactation milk (present study, absolute preference assays in Experiments 1 and 2) or oral seizing and sucking on a nipple coated with milk (see section II.2).

Thus, in our hands, the attraction of neonatal mice toward, and “wanting” of, colostrum and milk was unconditional of previous suckling experience, although their ability to discriminate between milk differing in terms of lactation stage appeared dependent on previous exposure to milk. The reasons why such similar approaches came to divergent outcomes remain to be resolved. It could reside in procedural details in assaying pups (development ages: 4-6 hours vs. 1 hour postpartum, maternal experience: vaginal delivery vs. delivered by C-section), or in the handling of the biological substrates (e.g., a fast degradation of the odor activity between collection and testing cannot be excluded).

Neonatal discrimination between colostrum and late lactation milk

In a previous study (see section II.2), newly born mouse pups were shown, before any suckling experience (P0), to grasp and suck the neutral nipple of a non-lactating dam at the condition that it has been coated with milk (or amniotic fluid). The potency of milk to elicit grasping/sucking did then rapidly improve with age, indicating that an initial level of positive response to milk odor is amplified by advancing sensorimotor maturation, and probably by accumulating suckling experience. The present study confirmed and extended these findings in raising an apparent effect of suckling experience in the development of pup responsiveness to milk taken at different lactation stages, i.e., colostrum and later-lactation milk (L3, L15). Unlike sucking-naïve P0 pups, P0+ pups that could briefly suckle on the day of birth were able to olfactorily differentiate between paired samples of early-lactation milk (L0 vs. L3 milk), as well as between colostrum and late-lactation milk (L0 vs. L15). This between-group difference relates to the pups' discrimination ability rather than to their sensitivity and attraction response toward the odors of murine milk (**Figure 26A-B**). In other words, while the general attractive value of colostrum and milk (as assessed in absolute attraction assays) does not depend on prior exposure to them, the ability to differentiate colostrum from late-lactation milk (as assessed in relative attraction tests) is influenced by the suckling experience pups of these two groups underwent before testing.

Initial suckling experience may have multiple influences on early odor *discrimination*, some relating to general processes and some to olfaction-specific causes.

First, it is clear that P0 and P0+ pups differed in age when they were tested (approximately 5 vs. 11 hours old, respectively), and, hence, in terms of adaptive recuperation from the “stress of being born” and of motor abilities required in the present behavioral assay. However, as the pups of either group were concordant in their response in the tests opposing colostrum/milk and the control, potential between-group motor disparities may be disregarded as a major cause.

Second, both groups of pups were fasted for 4 hours before being tested leading to a sharp contrast in their restlessness and motivated responses during testing. The P0 pups came to the test with an empty belly driving them to express an extreme arousal and motivation to approach any potential source of milk, with a final ceiling effect actualized in non-discriminative responsiveness. Alternatively, the P0+ pups who could suckle and had effectively milk in their stomach, may have behaved less speedily and could express an actual choice in favor of a milk odor over the other. To eliminate this possible source of variation, a future study should consider comparing pups infused with an age-adapted milk load before and after a controlled episode of suckling.

Thirdly, the nursing context is a concentrate of primary reinforcing agents for newborns. While being suckled, neonates are exposed to tactile, thermal, odor and taste stimuli from the mother's body and milk, they exert active probing, rooting, oral grasping and sucking motions, and eventually fill their stomach and reach satiation, all conditions that separately act as powerful rewards (Alberts, 1987; Blass, 1990; Blass & Teicher, 1980; Hudson et al., 2002; Rosenblatt, 1983). Suckling represents thus a privileged context to rapidly engage learning of any contingent stimulus, especially odors, and of relationships between odors and other stimuli, including physiological outcomes (e.g., Alberts & Ronca, 2012; Armstrong et al., 2006; Brake, 1981; Delaunay-El Allam et al., 2010; Terry & Johanson, 1996; Wilson & Sullivan, 1994). Inaugural suckling episodes, as well as arousal states induced in pups by maternal care, bear a special momentum for the neonates' learning of the first postnatal elements enriching their repertoire of meaningful odor cues (Cheslock et al., 2000; 2004; Miller & Spear, 2008, 2009, 2010; Wilson & Sullivan, 1994). Furthermore, nurturing-related reinforcers may operate additively on the neonatal brain which, in the hours following birth, is in a “sensitive” neurochemical state making newborns especially prone to learn any co-occurring odorant as a behaviorally-active cue (as shown in rat and human newborns; Lagercrantz & Herlenius, 2002; Ronca et al., 2006; Varendi et al., 2002; Wilson & Sullivan,

1994). Thus, if such a birth-related sensitive period happens in the mouse, being deprived from direct exposure to colostrum may not be equivalent in our P0 and P0+ pups. Therefore, the fact that the P0 pups could not discriminate the odors of L0 and L15 milk may be related to the absence of early exposure to L0 milk during a hypothetic sensitive period and the consequent deficiency in building any postnatal reference concerning L0 milk. An example of such separation-induced alteration in olfactory discrimination development is shown by Thomas et al. (2010). In contrast, exposure to L0 milk contingently to suckling in the P0+ pups allowed the establishment of such a reference and its actual use, in discrimination and preference tasks (in the mouse: Armstrong et al., 2006; Bouslama et al., 2005; Bollen et al., 2012; in the rat: Brake, 1981; Cheslock et al., 2000; Johanson & Hall, 1979, 1982; Johanson & Teicher, 1980; Sullivan & Hall, 1988; Wilson & Sullivan, 1994).

Finally, another interpretation for the non-discriminative response of P0 pups in face of paired L0-L15 milk odors refers to odor learning in the fetus. While some studies have shown that prenatal odor experience is sufficient to induce long-lasting changes in sensory and hedonic processes in neonatal rodents (Smotherman, 1982; Todrank et al., 2011), others found that pups will attach to an artificially odorized nipple only if that same odor has been previously encountered *in utero* (Alberts & Ronca, 2012; Pedersen & Blass, 1982). In the conditions of the present study, it cannot be excluded that the P0 pups, deprived of previous exposure to L0 milk, do not discriminate the odor of L0 milk from that of L15 milk because they missed postnatal re-exposure and reconsolidation to odor cues that they met in the prenatal environment. Numerous odor-active compounds are indeed common to amniotic fluid and colostrum/milk, building a thread of chemosensory continuity across the natal transition (Robinson & Méndez-Gallardo, 2010; Schaal, 2005).

Neonatal discrimination between pre- and post-suckling colostrum

A subsidiary goal of the present study was to weigh whether colostrum collected from a nipple that was previously suckled by an unfamiliar pup could be differentiated from colostrum collected prior any suckling. Such a difference may be linked to the fact that the very first colostrum may be more concentrated in certain elements which are discarded in the first milk discharge during the initial suckling episode. Such a compositional change between pre-suckling and post-suckling colostrum was noted in the mare, for example (Salimei et al., 2002). Another possibility may be that the newborns apply some odor label of oro-labial origin on the nipples they suckle (as noted in piglets or kittens, e.g., Ewer, 1961; Hemworth et al., 1976; Raihani et al., 2009) or that during the initial suckling bout pups distribute milk

bacteria all over the nipples' surface (e.g., Martin et al., 2004), leading to the rapid release of odor-active compounds. This label may then be washed away into milk during the milking procedure to finally influence pup responses in the assays.

Thus, Experiment 3 examined whether suckling-experienced P0+ pups differentiate pre-suckled and post-suckled colostrum. It came out that they oriented indiscriminately to the odors of colostrum collected 2-4 h post-birth prior to suckling and colostrum collected 8-15 h post-birth after the first suckling, leading to discard a potential impact of the pups on the attractive value of milk.

In conclusion, the present study demonstrated that some hours after birth mice are attracted to the odor of murine milk obtained from unfamiliar females in varying lactation stages. While suckling-naïve pups oriented non-selectively to the different milk odors, pups having had minimal suckling experience orient more to the odor of colostrum than to that of milk of later lactation stages. Thus, colostrum preference in newly born mice may depend on direct exposure during a first suckling experience. Future studies should investigate how the attractivity of milk odor is distributed along lactation, and to screen volatile compounds carried in milk along the lactational period, to end in verifying whether some milk odorants are uniquely active on neonatal behavior.

2.3) Conclusion

Ces deux dernières études (voir sections III.1 et III.2) mettent en lumière les capacités perceptives des souriceaux de différents âges face aux fluctuations des propriétés olfactives du lait murin. Il apparaît d'abord que les souriceaux de 0, 2, 6 et 15 jours sont attirés par l'odeur de laits murins quel que soit le stade de lactation auquel ces laits sont collectés. Par conséquent, le lait murin est porteur de composés volatils actifs pour les souriceaux dès la naissance.

Ensuite, les tests de préférence relative indiquent que les souriceaux ayant une expérience de tétée à P0, P2 et P6 manifestent une attraction sélective pour des odeurs de laits d'âges lactationnels précoces. Les souriceaux P0 (sans expérience de tétée) et P15, quant à eux, ne montrent pas d'attraction sélective envers un lait en particulier. Les souriceaux en développement montrent donc des réponses différentielles en fonction de leur niveau de développement et de l'âge lactationnel des laits murins. Ces réponses néonatales sont interprétées soit en termes d'altération des propriétés olfactives du lait au cours de la lactation, soit en termes de changements des capacités perceptives ou motivationnelles des souriceaux, ou encore par l'action conjointe de ces deux processus.

3) SELECTIVITE DES SOURICEAUX FACE AUX ODEURS DE LAITS ET DE TETINES DE FEMELLES D'UNE AUTRE SOUCHE

3.1) Introduction

Nous avons montré précédemment que le lait murin convoie une variété de composés olfactifs qui contrôlent le comportement néonatal d'approche et initient la saisie de la tétine chez les souriceaux dans les premières heures et jours de vie (voir sections II.1, II.2, III.1 et III.2). D'autre part, nous venons de décrire l'existence d'une certaine covariation entre les propriétés chimiosensorielles du lait et les préférences olfactives des nouveau-nés. De façon générale, une covariation entre l'odeur du lait et la perception des nouveau-nés suppose que les propriétés chimiosensorielles du lait sont un reflet de sa composition et que les nouveau-nés les détectent. Comme la composition du lait semble ajustée aux besoins nutritionnels, immunitaires et neuroendocriniens du nouveau-né (Ofstedal & Iverson, 1995 ; Veloso et al., 2003), un tel mécanisme devrait conférer un avantage adaptatif aux nouveau-nés.

Afin d'explorer plus en détail ce mécanisme, le **premier objectif** de cette présente étude vise à évaluer si la réactivité sélective des souriceaux BALB/c (B) de 2 jours (ci après abrégé en : P2_B) envers des laits d'âges précoces, est un mécanisme généralisable au lait d'autres souches de souris. Plus précisément, le lait murin de femelles d'autres souches de début de lactation serait-il également plus attractif pour les nouveau-nés? Afin de répondre à cette question, nous avons dans une première expérience examiné l'orientation préférentielle de souriceaux P2_B exposés à des laits de **différents stades de lactation prélevés chez des femelles C57BL/6 (C)**.

Le **second objectif** de cette étude évalue la réponse des souriceaux P2_B face à des **tétines de différents stades de lactation et/ou de différentes souches de souris**. Dans la seconde expérience, nous examinerons dans quelle mesure la tétine d'une femelle allaitante émet des indices olfactifs spécifiques de l'âge lactationnel de la femelle, déclenchant ainsi des réponses différentielles de saisie orale de la tétine en fonction du stade de lactation, et ce, quelle que soit la souche considérée (B ou C).

La souche **C57BL/6 (C)** a été retenue parce que : 1) la teneur en protéines, lactose et lipides de son lait diffère de celles de laits de la souche B (Belluardo et al., 1993; Ragueneau, 1987); et 2) au sein de la souche C, la teneur en protéines, lactose et lipides fluctue de façon marquée au cours de la lactation (Belluardo et al., 1993; Ragueneau, 1987). Si la composition du lait est reflétée par le profil olfactif, ces éléments permettent de prédire 1) que l'odeur de lait de la

souche C est différente de celle de la souche B et 2) que son profil olfactif fluctuera au cours de la lactation. Malgré des compositions de laits très différentes entre les souches de souris considérées (Belluardo et al., 1993; Ragueneau, 1987), l'hypothèse selon laquelle le lait murin aurait un pouvoir d'attraction olfactive plus puissante en phase de lactation précoce, reste envisageable quelle que soit la souche de souris.

Par ailleurs, l'exploration préférentielle des souriceaux de la souche B envers des laits d'âges précoces de leur propre souche, nous amène à supposer que ces mêmes souriceaux pourraient exprimer une réponse préférentielle envers les tétines de femelles d'âges lactationnels précoces de souche B. Enfin, un tel mécanisme de réponse sélective envers des tétines d'âges lactationnels précoces pourrait également être effectif envers des tétines de femelle allaitante d'une autre souche.

3.2) Réponses néonatales envers l'odeur de laits de la souche C57BL/6 prélevés à différents stades de la lactation

Cette expérience a pour but d'évaluer si la préférence olfactive des nouveau-nés de souche B envers des laits de stades de lactation précoces de leur propre souche (voir section III.1), est généralisable au lait d'une autre souche de souris. On se demandera en particulier: 1) si l'odeur des laits L2 et L15 de la souche C57BL/6 (L2_C et L15_C) est différenciable par les souriceaux de 2 jours (P2_B) et 2) si l'odeur du lait précoce L2_C est plus attractive que celle émise par un lait de lactation tardive L15_C pour les souriceaux P2_B.

Animaux et Méthodes

Conditions d'élevage

Chaque couple (mâle et femelle de la même souche) est maintenu dans une cage standard (28 x 17 x 13 cm) au sein de l'animalerie du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (Dijon, France). Les deux souches de laboratoire étudiées (*Mus musculus domesticus*, souches B et C) sont placées dans deux salles différentes, mais sous des conditions d'hébergement similaires et constantes : la température ambiante est de 22°C ± 2°C, le cycle Jour/Nuit est de 12h:12h (lumière de 7h30 à 19h30) et l'eau et la nourriture (Scientific Animal Food & Engineering, Ionisos Aube, Champagne) sont fournies *ad libitum*. Notons que la nature de croquettes délivrées est identique pour les deux souches. Par ailleurs, le mâle est laissé avec la

femelle pour favoriser sa contribution parentale et permettre la fécondation au cours de l'œstrus postpartum.

Animaux testés

Cent-vingt-trois souriceaux de la souche BALB/c (B) sont testés à l'âge de 2 jours (P2) (le jour de la naissance étant considéré comme jour P0). Cet âge a été choisi parce que les souriceaux P2_B: 1) sont capables de discriminer des odeurs de laits d'âges différents, collectés auprès de femelles B, et 2) sont facilement manipulables et adaptés aux conditions d'expériences. Chaque souriceau participe à une seule expérience. Avant un test, les souriceaux sont privés de contact maternel pendant une durée de 4 h afin de maximiser leur réactivité envers les stimulations. Au cours de cette période d'isolement, la cage contenant la portée et le père, est placée sur une plaque chauffante à 40°C dans le but de minimiser les risques d'hypothermie et de stress social. Des mesures thermiques ont, par ailleurs, révélé que la température du nid en condition d'isolement maternel sur plaque chauffante était similaire à la température cutanée des souriceaux mesurée en condition standard (respectivement 36.6 et 36.5°C), lorsque les deux parents sont présents dans le nid sans plaque chauffante. Les souriceaux testés proviennent de portées comprenant 4 à 8 souriceaux et 4 souriceaux au maximum par portée sont testés par expérience.

Stimuli

Le lait frais est collecté auprès de 29 femelles allaitantes (FA) de souche C, à des stades de lactation différents : lait de FA C au 2^{ème} jour de lactation (L2_C; collecté sur 10 FA), et laits de FA C au 15^{ème} jour de lactation (L15_C; collecté sur 9 FA). Le stimulus témoin est constitué d'eau. La procédure de traite est décrite dans les sections III.1 et III.2.

Dispositif et Procédures de tests

Dispositifs

Un test d'orientation céphalique (**Figure 27**), adapté à la motricité réduite des souriceaux de 0-2 jours, est utilisé (inspiré de Hepper, 1988). Le dispositif utilisé est décrit en détail dans les sections II.1 et II.2.



Figure 27. Dispositif utilisé pour évaluer l'attraction différentielle des souriceaux BALB/c âgés de 2 jours envers des stimuli olfactifs appariés.

Procédure et variables dépendantes

Les tests se déroulent dans une salle expérimentale afin d'éviter toute interférence olfactive au sein des salles d'élevages. L'expérimentateur A dépose 5 μ L de lait ou d'eau (selon les conditions de tests) sur chacune des vignettes. Le positionnement latéral des stimulations est randomisé. L'expérimentateur B n'est pas informé ni de la nature, ni de la position latérale des stimulations. L'expérimentateur B ganté tient le souriceau entre le pouce et l'index au niveau des épaules et l'approche successivement à 2-3 mm de chacune de deux sources olfactives pendant une durée de 6 secondes. L'ordre de présentation des stimuli est contrebalancé. Cette phase de pré-exposition olfactive permet au sujet d'avoir une expérience olfactive minimale des deux stimulations. Ensuite, le souriceau est aligné le long de la ligne tracée sur le papier buvard, de sorte que son museau est placé à 2-3 mm de chacune des stimulations olfactives. Le test démarre au moment où le museau du souriceau traverse la ligne médiane pour la première fois, pour une durée de 3 minutes. Le sujet est considéré comme étant positionné dans une moitié du dispositif quand ses deux narines traversent la ligne médiane. Les souriceaux n'ayant pas exploré les deux stimuli olfactifs au cours des 3 minutes de test sont exclus de l'analyse statistique. Les tests de 3 minutes sont filmés et analysés par l'expérimentateur B (non informé sur la position et la nature des stimuli) à l'aide du logiciel Observer (Noldus, Wageningen, the Netherlands). Le papier buvard et les vignettes sont remplacés après chaque essai.

Condition de tests

Dans l'Expérience 1A, nous avons évalué si les laits de la souche C prélevés au 2^{ème} et au 15^{ème} jour de lactation (L2_C et L15_C) émettent des odeurs détectables et attirantes pour les souriceaux P2_B par rapport au stimulus témoin: 1) Lait L2_C vs. Eau (Souriceaux P2_B: n= 23; de 6 portées), et 2) Lait L15_C vs. Eau (Souriceaux P2_B: n=21 ; de 6 portées). Dans l'Expérience 1B, nous avons testé si le lait de la souche C prélevé à un stade précoce de la lactation diffère en odeur de celui produit à un stade tardif pour des souriceaux P2_B. Les souriceaux P2_B (n= 25; de 7 portées) ont donc été exposés simultanément aux laits L2_C et L15_C.

Analyses statistiques

Afin de tester la normalité de nos données, des tests de Kolmogorov-Smirnov ont été réalisés pour tous les groupes expérimentaux (Statistica 8, Statsoft, Paris, France). Les données étant distribuées de façon normale, dans tous les groupes, des tests paramétriques ont donc été utilisés. L'orientation préférentielle des souriceaux a été évaluée à l'aide de tests *t* de Student à un échantillon, en comparant la durée totale passée dans une moitié du dispositif à la durée théorique passée si l'animal s'était orienté aléatoirement (*i.e.*, 90 s). Par ailleurs, les tests de Kruskal-Wallis n'ont montré aucun effet de portée ($1.717 < H < 8.941$, dans tous les cas, $p > 0.05$) et aucun effet de l'identité des femelles donneuses de lait ($1.717 < H < 7.296$, dans tous cas, $p > 0.05$).

Résultats

Expérience 1A) Détection de l'odeur de lait C57BL/6

Les souriceaux P2_B s'orientent plus longuement vers l'odeur des laits L2_C ($t = 4.999$; $p < 0.001$) et L15_C ($t = 3.115$, $p = 0.005$) que vers l'eau (**Figure 28**). Par conséquent, les laits C prélevés à différentes périodes de lactation, émettent une odeur attractive pour des souriceaux P2_B.

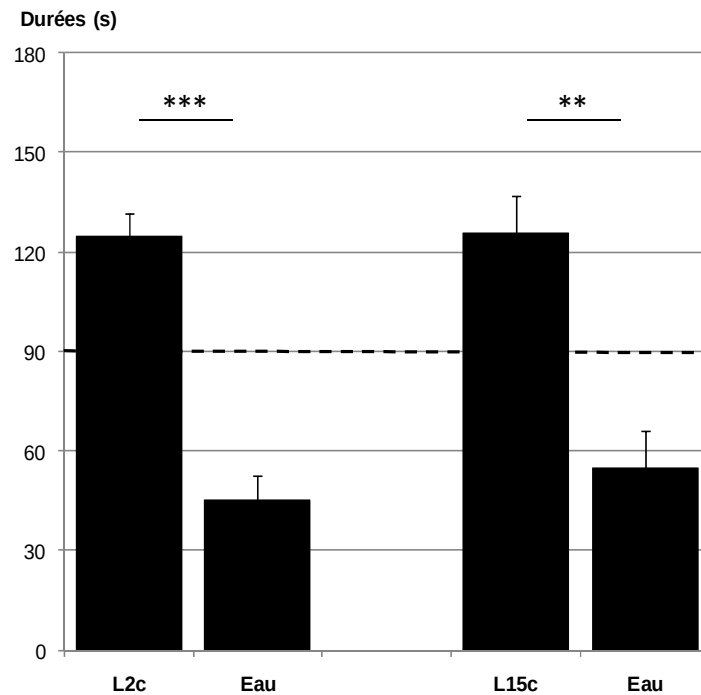


Figure 28. Durée moyenne ($\pm$ ES) passée dans un test d'orientation céphalique à double choix-olfactifs pour des souriceaux BALB/c de 2 jours exposés aux expériences suivantes : 1) lait de souche C57BL/6 produit au 2^{ème} jour de lactation (L2_C) versus Eau, et 2) lait de souche C57BL/6 produit au 15^{ème} jour de lactation (L15_C) versus Eau. Tests *t* de Student, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$. La ligne en pointillée indique le niveau de réponse aléatoire.

Expérience 1B) Discrimination entre des odeurs de laits C57BL/6 prélevés à différentes périodes de lactation

Les souriceaux P2_B passent plus de temps vers l'odeur de lait L2_C que vers celle de lait L15_C ($t = 1.896$; $p = 0,049$; **Figure 29**). Les souriceaux P2B discriminent ainsi des laits de stades de lactation contrastés chez la souche C en se basant sur l'odeur. De plus, ils expriment une orientation préférentielle vers l'odeur du lait précoce (L2) par rapport à celle d'un lait de stade de lactation plus avancé (L15).

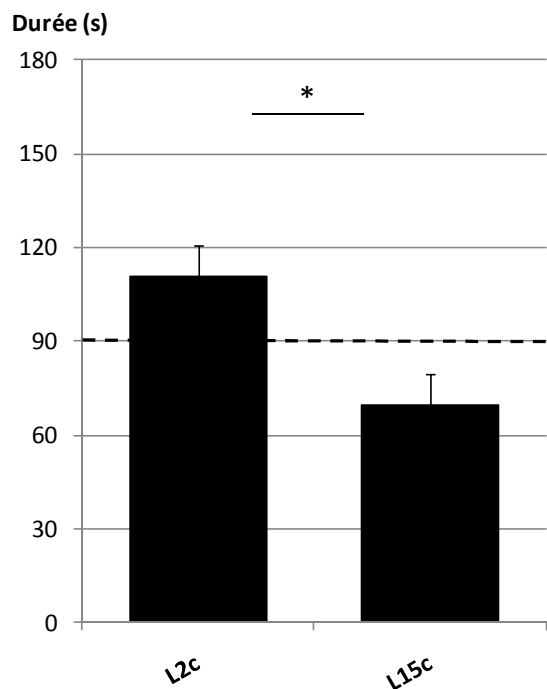


Figure 29. Durée moyenne ($\pm$ ES) passée dans un test d'orientation céphalique à double choix-olfactifs pour des souriceaux BALB/c de 2 jours exposés aux laits de souche C57BL/6 du 2^{ème} jour de lactation (L2_C) versus du 15^{ème} jour de lactation (L15_C). Tests *t* de Student, * $p < 0.05$. La ligne en pointillée indique le niveau de réponse aléatoire.

3.3) Réponses néonatales envers des télines de femelles allaitantes (BALB/c et C57BL/6) à différentes périodes de lactation

Dans l'Expérience 1, nous avons mis en évidence que les souriceaux P2_B étaient attirés par les odeurs de laits C quel que soit l'âge lactationnel, et expriment une préférence envers l'odeur de lait L2_C par rapport au lait L15_C. Ces résultats corroborent ceux obtenus par des souriceaux P2_B exposés aux laits de leur propre souche B. Ainsi, l'attractivité du lait diminue au cours de la lactation aussi bien pour des laits de la même souche (section III.1), que pour des laits d'autres souches (souche C).

Dans quelle mesure ces réponses préférentielles des souriceaux P2_B en faveur des laits de stades de lactation précoces sont-elles transposables à l'odeur des télines de souris allaitante ? En d'autres termes, est-ce que des souriceaux nouveau-nés répondraient plus efficacement à une tétine de femelle d'âge lactationnel précoce par rapport à celle d'âge lactationnel tardif et ceci quelle que soit la souche considérée ? L'Expérience 2 vise ainsi à comparer si: 1) l'odeur

des tétines de souris B et C déclenchent la saisie orale de la tétine chez des souriceaux P2_B ; et 2) l'odeur des tétines de souris B et C induisent des réponses de tétée différentielles en fonction de l'âge lactationnel des femelles allaitantes. En nous appuyant sur les résultats de l'Expérience 1, nous prédisons que les souriceaux P2_B devraient exprimer une tétée plus efficace sur une tétine de femelles au 2^{ème} jour qu'au 15^{ème} jour post-partum, et ce quelle que soit la souche.

Animaux et Méthodes

Conditions d'élevage

Les conditions d'élevage ont été décrites dans la première expérience (p. 122-123).

Animaux testés

Quatre-vingt-six souriceaux BALB/c (B) sont testés à l'âge de 2 jours. Les animaux testés ont été décrits en détail dans la première expérience (p. 123).

Stimuli

Les souriceaux ont été mis en contact avec une tétine de femelle allaitante de différents stades de lactation et/ou de différentes souches: 1) femelle allaitante de souche B au 2^{ème} jour de lactation (n = 7), femelle allaitante de souche B au 15^{ème} jour de lactation (n = 5), femelle allaitante de souche C au 2^{ème} jour de lactation (n = 6), femelle allaitante de souche C au 15^{ème} jour de lactation (n = 5). Dans tous les cas, ces femelles sont non familières pour le souriceau (*i.e.*, sa propre mère n'a jamais été utilisée).

Procédure et variables

Un test comportemental de 2 minutes (adapté de Dollinger et al., 1978; Pedersen & Blass, 1982; Todrank et al., 2005) est utilisé pour évaluer la réponse de saisie orale d'une tétine maternelle par les souriceaux. Les femelles stimuli sont séditées à l'aide d'une injection d'anesthésiant (Imalgène 1000 et Rompun 2%, dosée respectivement à 0.45 and 0.9 mg/g de masse corporelle). Un expérimentateur A ganté tient la femelle par la peau du dos et présente verticalement son abdomen au souriceau (**Figure 30**). Afin d'exposer au mieux la tétine, les poils entourant la tétine sont écartés à l'aide d'un coton-tige. Le souriceau est tenu au niveau de ses épaules par un expérimentateur B entre le pouce et l'index. Le test de 2 minutes débute au moment où le museau du souriceau est mis en contact léger avec la tétine de la femelle stimulus (distance museau-tétine=0 mm, sans pression). Les tests sont filmés pour coder et

analyser ultérieurement les réponses de saisie de la tétine (pourcentage, latence et durée) et le nombre de mouvements oraux après la saisie.

Le **pourcentage de souriceaux saisissant la tétine** et le **temps de latence avant la première saisie orale de la tétine** ont été relevés afin d'évaluer le niveau d'attraction et de motivation des souriceaux pour téter, alors que **le nombre de mouvements oraux effectués après la saisie de la tétine** a été considéré comme un indice d'avidité de la réponse de succion. La réponse de saisie orale est identifiée lorsque le souriceau ouvre son museau et referme ses lèvres autour de la tétine, puis, réalise des mouvements de succion de la tétine.

Seules les quatre tétines inguinales ont été présentées aux souriceaux (une femelle est donc utilisée pour tester 4 souriceaux). Après les tests, les souriceaux ont été replacés dans leur cage d'hébergement alors que les femelles-stimulus ont été déposées dans une cage individuelle, placée sur une plaque chauffante à 40°C.



Figure 30. Souriceaux BALB/c de 2 jours de vie exposés à une tétine de femelle allaitante non familière de souche: 1) BALB/c au 2^{ème} jour de lactation (à gauche), et 2) C57BL/6 au 2^{ème} jour de lactation (à droite).

Conditions de tests

Afin d'examiner la réponse néonatale de saisie orale de la tétine, des souriceaux P2_B ont été exposés à une des quatre expériences suivantes : 1) une tétine T2_B (Souriceaux P2_B: n =24, de 7 portées) ; 2) une tétine T15_B (n =20, de 7 portées) ; 3) une tétine T2_C (n =22, de 8 portées) ; et 4) une tétine T15_C (n =20, de 8 portées).

Analyses statistiques

Les tests de Kolmogorov-Smirnov indiquent que la distribution des données ne suivait pas la Loi Normale dans la plupart des groupes expérimentaux, justifiant l'utilisation de statistiques

non-paramétriques. Afin d'évaluer un effet potentiel du stade de lactation, nous avons comparé les performances de saisie orale entre les groupes exposés aux tétines L2 et L15 au sein de chaque souche: a) le pourcentage de souriceaux saisissant une tétine L2 et L15 à l'aide de tests exacts de Fisher ; et b) la latence de saisie orale de la tétine, la durée totale et le nombre de mouvements oraux par seconde pendant la saisie des tétines L2 et L15 avec des tests de Mann-Whitney (Statistica, Version 8, Statsoft France, Paris). Les analyses quantitatives sur la latence, durée et nombre de mouvements par seconde, ont été effectuées uniquement pour les souriceaux ayant réalisés une réponse de saisie orale.

Résultats

Exposés à des tétines de femelles allaitantes de leur propre souche, les souriceaux P2_B saisissent plus fréquemment une tétine T2_B qu'une tétine T15_B ($p=0.027$; **Figure 31**). De plus, pour les individus ayant saisi une tétine, la tétine T2_B induit des mouvements oraux plus fréquents qu'une tétine T15_B ($U=71.5$, $p=0.029$). Pour finir, la latence de saisie et la durée moyenne de saisie se sont avérées identiques pour les tétines T2_B et T15_B (respectivement, $U=123$, $p=0.746$; $U=110$; $p=0.428$). Par conséquent, pour les souriceaux P2_B, l'odeur d'une tétine T2_B est indéniablement plus efficace pour déclencher une saisie orale de la tétine que l'odeur d'une tétine T15_B.

Exposés à une tétine de la souche C, les souriceaux P2_B présentent une fréquence, une latence et une durée de saisie, similaires pour les tétines T2_C et T15_C (respectivement, $p=0.768$; $U=57$, $p=0.818$; $U=55$, $p=0.718$). Cependant, la tétine T2_C induit des mouvements oraux plus fréquents qu'une tétine T15_C ($U=29$, $p=0.039$).

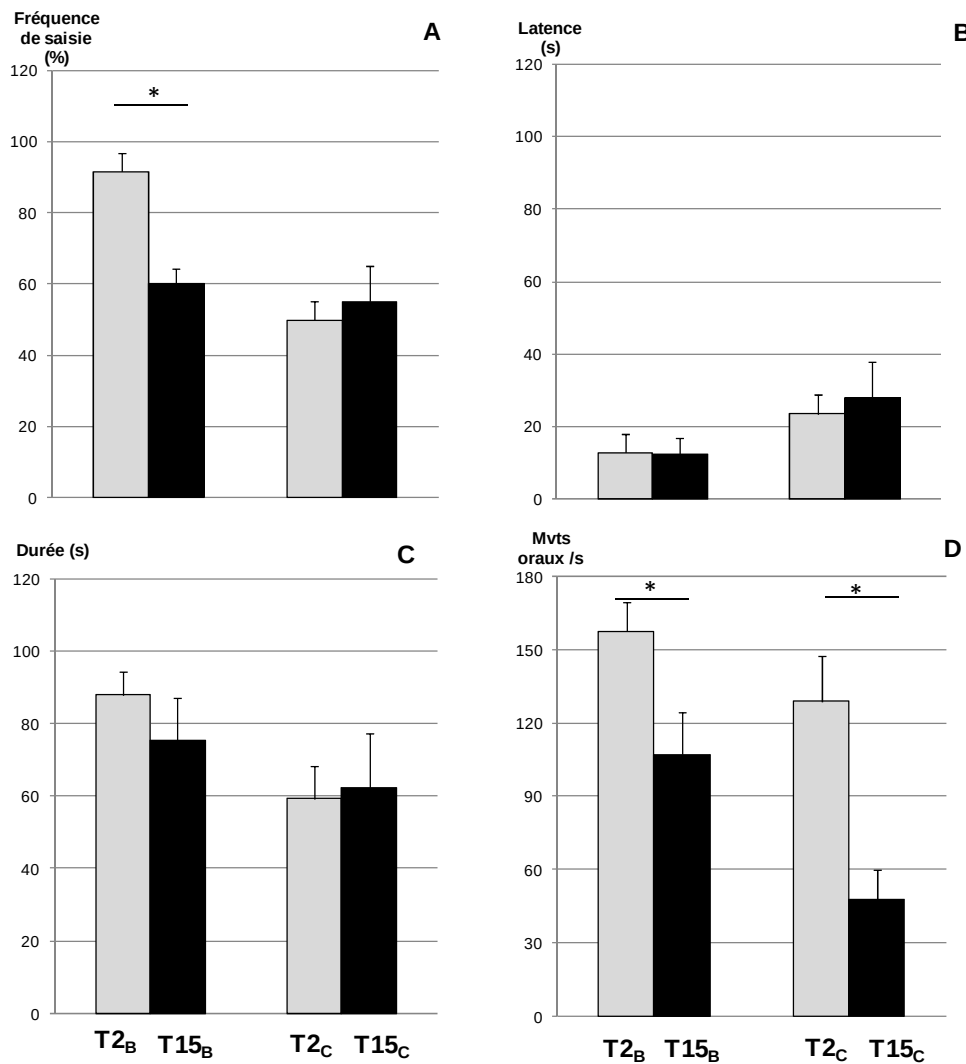


Figure 31. Réponses de saisie orale des souriceaux BALB/c de 2 jours exposés à une tétine de femelle allaitante de stade de lactation et/ou de souche différents: tétine BALB/c au 2^{ème} jour de lactation (T2_B), tétine BALB/c au 15^{ème} jour de lactation (T15_B), tétine C57BL/6 au 2^{ème} jour de lactation (T2_C), et C57BL/6 au 15^{ème} jour de lactation (T15_C).

A : Pourcentage de souriceaux saisissant la tétine (Test exact de Fisher, * $p < 0.05$), B : Latence ($\pm$ ES) pour la première saisie de tétine (Mann-Whitney test, * $p < 0.05$), C : Durée totale ($\pm$ ES) de saisie (Mann-Whitney test, * $p < 0.05$), D : Nombre de mouvements oraux par seconde ($\pm$ ES) pendant la saisie orale de la tétine (Mann-Whitney test, * $p < 0.05$).

N. B. : Caractéristiques du comportement de saisie orale de tétine (cf. latence, durée, et nombre de mouvements oraux par seconde) relevées uniquement pour les souriceaux ayant saisi une tétine dans les 2 min de test.

3.4) Discussion

Cette étude vise à vérifier si la covariation entre l'odeur du lait et la chimiosensation des souriceaux est un mécanisme généralisable aux laits d'autres souches de souris, mais aussi aux télines de femelles allaitantes (intra et inter-souche). Dans l'Expérience 1, les souriceaux P2_B détectent l'odeur des laits L2 et L15 de la souche C, soulignant le pouvoir attractif général du lait murin, indépendamment de la souche. Mais, le résultat le plus important se rapporte à la capacité de ces souriceaux de discriminer olfactivement entre les laits L2_C et L15_C, indiquant ainsi que le lait C émet des composés volatils plus actifs au 2^{ème} qu'au 15^{ème} jour de lactation pour les souriceaux P2_B.

L'Expérience 2 examine l'attractivité de l'odeur de télines de femelles allaitantes en soumettant les souriceaux à un test de saisie orale. Tout d'abord, les télines de femelles allaitantes, quels que soient la souche et l'âge lactationnel testés, déclenchent des réponses de saisie plus fréquentes que les télines de femelles non allaitantes de souche B (voir section II.2). Ensuite, les souriceaux P2_B effectuent des saisies orales plus fréquentes des télines T2_B que des télines T15_B. Finalement, pour la souche C, les souriceaux n'ont été discriminants qu'au niveau de l'intensité de leur activité de succion; en effet, la fréquence de succion est plus rapide sur la tétine T2_C que sur la tétine T15_C.

De telles réponses mettent en lumière à la fois le changement des propriétés sensorielles du lait et de la tétine au cours de la période de lactation, et une spécificité des indices sensoriels émis par les femelles allaitantes des souches B et C.

Réponse sélective des souriceaux P2_B envers des laits d'âges précoces issus de la souche C57BL/6 (C)

L'Expérience 1 met en lumière que la réponse sélective des souriceaux P2_B en faveur des odeurs de laits d'âges lactationnels précoces B, est généralisable aux odeurs de laits d'âges lactationnels précoces de la souche C. Si l'on considère les souriceaux nouveau-nés comme des « nez », ceux-ci nous révèlent que, pour les deux souches examinées ici, les laits précoces sont plus attractifs que les laits tardifs. Le mécanisme sous-jacent à cette hétérogénéité hédonique du lait n'est pas expliqué à ce stade de la recherche. Aucune étude n'a, à ce jour, analysé le profil odorant du lait de souris au cours de la lactation. Néanmoins, une étude a mis en évidence des différences de composition du lait de la souche C, en termes de concentration de macronutriments sur une période courte entre le 6^{ème} et le 9^{ème} jour de lactation (Belluardo

et al., 1993; Ragueneau, 1987). Il n'est pas exclu que de telles variations des composés au cours de la lactation pourraient être olfactivement détectées par les nouveau-nés.

Réponse sélective des souriceaux P2_B à des tétines de femelles d'âges lactationnels précoces (souches B et C)

L'Expérience 2 met en lumière que la réponse des souriceaux P2_B en faveur des odeurs de laits d'âges lactationnels précoces est transposable à l'odeur de la tétine de FA d'âges lactationnels précoces, mais uniquement pour des tétines de leur propre souche B. Ce résultat corrobore celui de Holloway et al. (1978), qui ont mis en évidence que les ratons de 2-3 jours s'attachent plus rapidement à une tétine de ratte allaitante aux 2-3^{èmes} jours de lactation qu'à une tétine de ratte de 10 jours de lactation. Plusieurs possibilités peuvent expliquer cette réponse différentielle néonatale : 1) les propriétés thermiques de la tétine changent au cours de la lactation ; cependant, des mesures thermiques, effectuées par Holloway et al. (1978), révèlent que les tétines de rattes T2 et T15 ont la même température ; 2) Les propriétés morphologiques de la tétine varient au cours de la lactation, avec une augmentation du diamètre et de la longueur de la tétine entre les 2-3^{èmes} et le 10^{ème} jour postpartum (observations personnelles chez la souris ; Holloway et al., 1978); Enfin, 3) les indices olfactifs émis par la tétine pourraient fluctuer notablement au cours de la lactation. La tétine est, en effet, recouverte d'une multitude de substrats odorants dont l'assemblage dépend étroitement du stade de lactation de la femelle et de la maturation du jeune. On peut supposer que c'est cette dynamique olfactive que les souriceaux détectent. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les souriceaux P2_B préfèrent l'odeur du lait L2_B à celle du lait L15_B. Tout comme l'odeur de lait, d'autres substrats/indices délivrant des informations chimiosensorielles sur l'âge lactationnel de la femelle pourraient également contribuer à l'expression de cette réponse sélective de saisie de la tétine.

Il est toutefois apparu que l'avidité à téter des souriceaux P2_B était plus forte sur les tétines d'âge lactationnel précoce, quelle que soit la souche considérée. Il convient de souligner que, si le pourcentage et la latence de saisie nous renseignent sur le pouvoir des odeurs impliquées dans l'induction du comportement de saisie, l'avidité de la succion lorsque le souriceau a en bouche la tétine fait intervenir les caractéristiques olfactivo-gustatives, et aussi bien que morphologiques de la tétine. Il serait donc envisageable que les souriceaux P2_B aient plus de difficultés à téter efficacement une tétine ayant une longueur et un diamètre plus importants qu'une tétine adaptée à leur âge (Holloway et al., 1978). Nous pourrions également supposer

que les propriétés olfactivo-gustatives de la tétine soient plus appétitives en début de lactation qu'en fin de lactation. Ceci pourrait être lié aux propriétés propres à la tétine ou à des résidus de substrats attractifs, tels que les salives maternelle et infantile ou le lait.

3.5) Conclusion

En résumé, ces résultats fournissent un premier élément sur la généralisabilité de la réponse préférentielle des souriceaux P2_B pour des laits d'âges précoces. Des études complémentaires sur l'impact comportemental de l'odeur des laits d'autres souches murines ou d'autres espèces (e.g., rat, vache) seraient utiles pour mieux appréhender la question de la généralité de ce mécanisme. Ces tests expérimentaux pourraient également être reproduits avec des souriceaux P2 d'autres souches de souris. Pour finir, l'implication des mécanismes (plastiques et/ou prédisposés) sous-jacents aux réponses sélectives néonatales face à des odeurs maternelles d'âges lactationnels précoces pourraient être clarifiés par des méthodes d'adoption croisée. Des portées pourraient être adoptées à la naissance par des femelles allaitantes d'un âge lactationnel plus avancé (10-15^{ème} jour postpartum) et ces souriceaux seraient testés à P2 avec un lait familial L10-15 et un lait de leur âge L2. Trois possibilités s'offrent à nous : soit les souriceaux préfèrent l'odeur du lait familial L10-15, signifiant qu'un apprentissage olfactif serait mis en jeu dans la réponse néonatale, soit les souriceaux s'orientent plus longuement vers l'odeur du lait L2, ce qui indique que le lait précoce, même inconnu, véhicule des composés odorants plus attractifs que ceux émis en milieu/fin de lactation ; cette réponse pourrait donc être prédisposée, ou acquise *in utero* puis pistée à partir de la continuité olfactive existant entre le liquide amniotique et le lait de lactation précoce. Enfin, le fait que les souriceaux s'orientent de façon similaire vers les laits L2 et L15, suggèrerait que les deux mécanismes opèrent conjointement sur les réponses néonatales.

Des expériences complémentaires ont été réalisées et sont décrites dans l'Annexe 5.

IV) DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le but de cette recherche visait à étudier l'ontogenèse des comportements qui mènent à l'ingestion du lait chez la souris. Elle a mis en lumière le rôle de l'olfaction dans les premiers comportements orientés et dans les activités orales préparatoires à la prise lactée chez le souriceau nouveau-né. Trois résultats majeurs peuvent être soulignés: 1) la caractérisation de substrats olfactifs de la femelle allaitante qui sont réactogènes pour le nouveau-né; 2) l'identification des processus psychobiologiques (apprentissage vs. réponses prédisposées) intervenant lors de l'établissement de la tétée; enfin, 3) la covariation entre propriétés sensorielles du lait murin et préférence olfactive des souriceaux au cours du développement précoce. Ces aspects sont discutés ci-après en particulier en ce qui concerne les mécanismes potentiellement impliqués.

Dans cette recherche, nous avons choisi d'évaluer des stimuli olfactifs ne provenant pas de la mère des souriceaux testés dans le but d'examiner des facteurs odorants supra-individuels produits par la femelle allaitante sur la tétine et dans le lait.

1) SUBSTRATS OLFACTIFS EMIS PAR LA FEMELLE ALLAITANTE ET REACTOGENES CHEZ LE NOUVEAU-NE

1.1) La femelle allaitante : Généralement attractive

Dans notre premier axe de recherche, nous souhaitons comprendre comment un souriceau nouveau-né, doté de systèmes somesthésiques et chimiosensoriels fonctionnels à la naissance, réussissait à localiser et à téter une tétine dans les premières heures de vie postnatale. Tout d'abord, l'hypothèse générale selon laquelle les odeurs de femelles allaitantes, et plus particulièrement, les odeurs mammaires gouvernent l'activité d'ingestion des nouveau-nés, a été validée. Nous avons notamment mis en évidence que les odeurs abdominales de souris allaitantes sont plus attractives pour des souriceaux que celles émises par une souris non allaitante (section II.1). Cela indique que la production du colostrum et du lait s'accompagne de l'émission d'indices odorants qui motivent et dirigent les nouveau-nés vers les régions mammaires. Les indices olfactifs actifs ne sont toutefois pas distribués de façon homogène sur le corps de la femelle allaitante, mais localisés sur ou autour des structures mammaires, et déclenchent spontanément des réponses de recherche et de saisies orales quasi-systématiques (section II.1 et II.2). Le fait d'émettre des indices olfactifs pour diriger les nouveau-nés vers la tétine/mamelle et en motiver la tétée est une stratégie commune aux femelles allaitantes de mammifères, quel que soit le type d'organisation des échanges mère-jeune (souris : Hongo et

al., 2000 ; rat : Galef & Muskus, 1979 ; Hofer et al., 1976 ; Teicher & Blass, 1976 ; lapin : Hudson & Distel, 1983 ; Moncomble et al., 2005 ; chat : Larson & Stein, 1984 ; Raihani et al., 2009 ; humain : Doucet et al., 2007 ; mouton : Vince et al., 1987 ; porc : Morrow-Tesh & McGlone, 1990).

1.2) La nature de substrats olfactifs maternels actifs

1.2.1) Synthèse des résultats obtenus

Dans la section II.1, les effluves du lait et des salives maternelle et infantile sont apparus très attractives pour des souriceaux de 5-6 jours dans un test d'attraction absolue (comparaison avec de l'eau) et le pouvoir attractif de chacun des substrats s'est avéré équivalent. Nous supposons intuitivement que l'odeur de lait serait plus explorée que les deux autres substrats, du fait de l'état de faim des nouveau-nés (4 h d'isolement maternel) et des attentes évoquées en les exposant à cette odeur alimentaire. Cependant, ce test d'exploration à double choix olfactif, ne nous donne qu'un indice général de la motivation du souriceau. Par conséquent, des mesures comportementales complémentaires plus fines, telles que le nombre de mouvements oraux, auraient peut-être pu mettre en évidence des réponses différentielles envers le lait. Malgré ce résultat inattendu, deux nouvelles hypothèses, développées dans la Discussion de la section II.1, ont permis d'expliquer cette équivalence motivationnelle entre les différents substrats. La première se réfère à la présence de composés odorants communs aux trois substrats. En effet, la salive et le lait partagent des composés volatils similaires dérivés du régime alimentaire ou du métabolisme général (Bronstein et al., 1975 ; Galef & Henderson, 1972). La seconde interprétation, la plus probable, serait que les odeurs de lait et de salives soient associées aux mêmes causes de renforcements procurés par la mère (léchages, tétées et chaleur).

Afin d'évaluer l'impact de ces apprentissages olfactifs précoces associés aux premières interactions avec la mère et l'ingestion de lait, la section II.2 s'est employée à tester le comportement des souriceaux en fonction de leur expérience de tétée préalable au cours des premières 36 h. Nous souhaitons, cette fois-ci, caractériser la nature du ou des substrat(s) biologique(s) capables d'induire le comportement de tétée chez le souriceau. Déposés sur une tétine de femelle non allaitante, le **liquide amniotique** et le **lait murin** induisent la saisie orale de la tétine chez les souriceaux à la naissance, et ce, avant toute expérience de tétée et d'exposition au lait (**Figure 32**). La **salive de femelle allaitante** commence à déclencher la

saisie orale chez les souriceaux de 5-8 h, avec une expérience de tétée de 1-4 h. Enfin, après 24 h d'expérience de tétée, la **salive infantile** devient également saillante pour les souriceaux P1. Il est intéressant de souligner que l'exposition maternelle renforçante, à laquelle ont été soumis les souriceaux après leur naissance (i.e., 1-3 h de léchages, chaleur et odeurs maternels), ne confère pas à la salive de femelle allaitante le pouvoir d'induire la tétée.

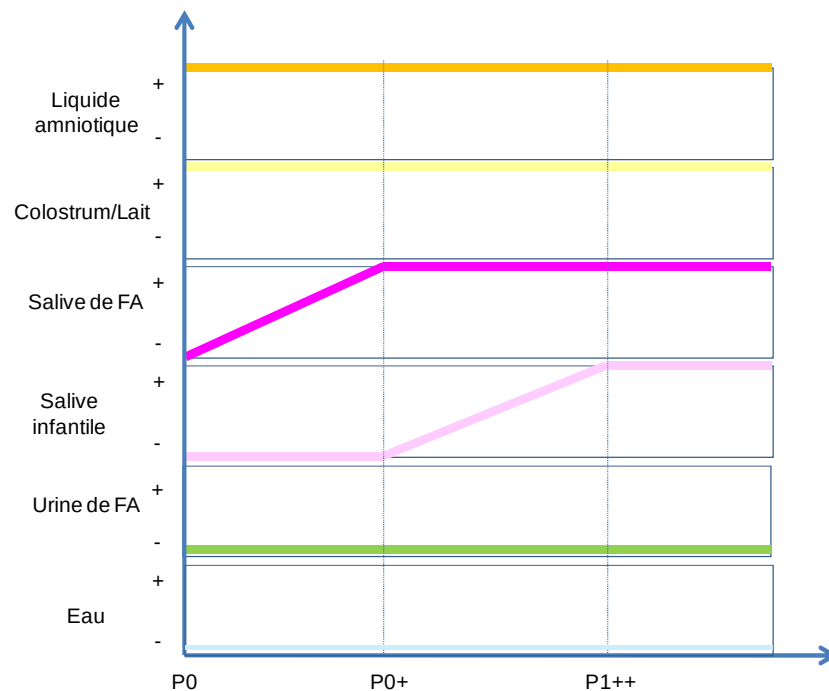


Figure 32. Schéma des substrats impliqués dans les premières saisies orales de la tétine en fonction de l'expérience de tétée des souriceaux. Le signe « + » indique l'implication d'un substrat dans l'initiation du comportement de tétée. Le signe « - » souligne l'absence d'implication d'un substrat dans l'initiation du comportement de tétée [Liquide amniotique, colostrum/lait, salive de femelle allaitante (FA), salive infantile, urine de femelle allaitante (FA), eau (contrôle)].

1.2.2) Les mécanismes sensoriels impliqués dans l'induction de la tétée chez les rongeurs et les autres mammifères

1.2.2.1) Souris

Au moment de la rédaction de cette Discussion Générale, une étude relativement similaire à la notre est parue dans *Current Biology* (Logan et al., 2012). Tout comme dans nos travaux, Logan et al. (2012) ont testé la capacité des souriceaux à la naissance à initier la saisie orale d'une tétine de femelle allaitante lavée puis enduite de différents odorants dans un test de 2 minutes. Ces auteurs ont rapporté que 100% des souriceaux saisissaient une tétine de femelle

allaitante dans les 60 premières secondes du test, contre 92% rapporté dans notre étude. Nos deux études confirment donc que les indices olfactifs émis par la tétine de souris allaitante contribuent à initier ce comportement car les nouveau-nés exposés à une tétine de femelle allaitante lavée à l'eau, ou à une tétine de femelle non allaitante, affichent une performance de tétée fortement altérée. De plus, Logan et al. (2012) ont montré que pour des souriceaux de 12 h de vie, ayant eu au moins une expérience de tétée, les odeurs de liquide amniotique, de salive de femelle allaitante et de lait, restaurent la saisie d'une tétine de femelle allaitante préalablement lavée, alors que les odeurs d'urine maternelle, de salive de femelle vierge et d'odorants non biologiques ne sont pas impliquées dans ce comportement. Ces résultats se sont avérés similaires aux nôtres chez des souriceaux BABL/c de 5-8 h de vie ayant eu au moins une expérience de tétée.

Nous pouvons néanmoins relever une différence au niveau de la performance de tétée : L'ajout de liquide amniotique, de salive de femelle allaitante et de lait sur une tétine de femelle allaitante lavée induit la saisie orale de celle-ci dans les mêmes proportions qu'une tétine de femelle allaitante intacte (100% dans les 60 premières secondes de test) alors que, dans notre étude, ces substrats induisent la saisie orale d'une tétine de femelle non allaitante dans des proportions plus modérées (50 à 60% des souriceaux saisissent une tétine). Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'une tétine de femelle allaitante lavée est intrinsèquement plus attractive qu'une tétine de femelle non allaitante pour les souriceaux car 55% des souriceaux saisissent une tétine de femelle allaitante lavée alors que 25 % saisissent une tétine de femelle non allaitante au cours des 2 minutes de test. Un lavage à l'eau ne permet pas d'enlever toutes les molécules, comme par exemple les molécules hydrophobes, ce qui pourrait expliquer l'attrait que continuent à exprimer les souriceaux à l'égard de cette tétine lavée à l'eau. Il convient de noter que, chez le rat, une tétine de femelle allaitante, ayant subi un lavage à l'aide d'une solution de chlorure de méthylène et d'éthanol, n'est saisie que par 10% des ratons à la naissance (Teicher & Blass, 1976, 1977).

Logan et al. (2012) ont également testé la réponse de souriceaux nés par césarienne. Ces souriceaux, privés de toute expérience maternelle (léchages et tétée), saisissent uniquement une tétine intacte de femelle allaitante ou une tétine lavée puis badigeonnée de liquide amniotique. Contrairement aux souriceaux expérimentés, la salive de femelle allaitante et le lait ne déclenchent pas de saisie orale chez des animaux inexpérimentés, ce qui suggère que l'activité comportementale de la salive de femelle allaitante et du lait résulterait d'un conditionnement préalable. Logan et al. (2012) ont également confirmé qu'une brève

d'association entre des stimulations mimant les léchages maternels et un odorant est suffisante pour induire, 1 h après l'association, la saisie d'une tétine de femelle allaitante lavée puis odorisée à cet odorant. Toutefois, aucune information n'est fournie dans leur procédure concernant la durée de l'association. En d'autres termes, ces résultats soulignent que tout type d'odorant (salive de femelle allaitante, lait, colostrum, salive de femelle vierge, vanille) présent au moment des léchages maternels, pourrait gagner un pouvoir d'induction de la saisie de la tétine, et ce, dès les premières 5 minutes de vie postnatale.

Ces résultats ne corroborent que partiellement les nôtres. Dans notre étude, nous avons mis en évidence qu'une brève expérience de tétée était nécessaire pour que la salive de femelle allaitante induise la saisie d'une tétine, mais qu'une simple expérience maternelle sans tétée (léchages, chaleur) n'était pas suffisante pour cela.

Un autre point de divergence entre nos études désigne le rôle du colostrum dans l'initiation de la première saisie orale d'une tétine. Selon Logan et al. (2012), le colostrum n'induit le comportement de tétée qu'après association avec un stimulus inconditionnel (tactile, par exemple). Pour expliquer le pouvoir initial du colostrum dans notre étude, nous émettons l'hypothèse que les souriceaux auraient pu être exposés à des traces de lait émanant des tétines maternelles avant leur séparation et en acquérir ainsi l'odeur au cours de la phase d'apprentissage facilité par la parturition (Alberts & Ronca, 2012). A notre connaissance, un tel phénomène n'a cependant pas été mis en évidence à ce jour. De plus, cette hypothèse apparaît peu robuste car la salive de femelle allaitante, présente dès les premiers instants de vie postnatale, n'est conditionnée qu'après une brève expérience de tétée et non après des léchages maternels.

Une seconde possibilité pourrait être que la qualité du colostrum ne soit pas intacte au moment du test de Logan et al. (2012). En effet, les composés volatils du colostrum/lait de lapin et d'humain n'induisent plus de réponses positives 20-30 min après leur obtention chez le lapereau (Keil et al., 1990 ; Schaal et al., 2003) et quelques heures après l'extraction dans le cas du lait humain (*non publié*). Afin de limiter ces pertes, nous avons pris un soin extrême à réduire le temps de traite, à conserver le lait dans la glace immédiatement après éjection, et à tester aussi vite que possible les nouveau-nés. Dans le cas de l'étude de Logan et al. (2012), aucun élément temporel concernant la collecte de lait n'a été fourni.

En somme, il serait donc préférable d'évaluer le comportement des souriceaux nés par césarienne (dépourvus de tout contact avec la mère), pour pouvoir réellement comparer nos résultats à ceux obtenus par Logan et al. (2012).

1.2.2.2) Rat

Au vu des similarités phylogénétiques et développementales communément admises chez la souris et le rat, nous supposons que les mécanismes sensoriels et cognitifs régissant l'initiation du comportement de tétée seraient ressemblants. Mais, cette ressemblance fonctionnelle n'est valide que partiellement. Comme nous l'avons observé chez la souris (section II.2; Kodama, 1990), l'odeur de liquide amniotique initie la saisie orale des tétines chez le raton à la naissance (Pedersen & Blass, 1981, Teicher & Blass, 1977). Par contre, la salive maternelle est un substrat saillant pour le raton inexpérimenté (Teicher & Blass, 1977), alors que les souriceaux P0 n'y répondent qu'après une expérience de tétée (section II.2). Cette différence comportementale est surprenante car les ratons P0 ont été soumis à la même expérience maternelle que nos souriceaux P0 (portée séparée de la mère avant la première tétée). Cette différence de réponse à la salive maternelle notée entre le rat et la souris n'est donc pas associée à une différence d'exposition à cette odeur, et demande à être confirmée.

Après plusieurs expériences de tétée, la salive infantile ainsi qu'un composé présent dans la salive infantile (le diméthyle-disulfure), provoquent la saisie orale de la tétine chez les ratons de 2 jours de vie (Blass, & Teicher, 1980 ; Teicher & Blass, 1976 ; Pedersen & Blass, 1981; Smotherman & Robinson, 1992). A ce jour, aucune étude n'a testé le rôle de ce substrat et de ce composé chez des ratons d'âges plus précoces. Sachant que la salive infantile n'est pas olfactivement active chez la souris à la naissance et qu'elle n'est pas présente sur les tétines avant la première tétée, on peut s'attendre à ce que ce substrat n'ait aucun pouvoir d'induction de la première saisie de tétine chez le raton.

De façon surprenante, l'action du colostrum/lait n'a pas été testée avant l'âge de 7-8 jours chez le raton. A cet âge, les odeurs de lait de ratte et de lait bovin n'auraient pas le pouvoir d'initier le comportement de tétée (Singh & Hofer, 1978). Cependant, les résultats obtenus chez la souris laissent supposer que le lait devrait également initier la tétée chez le raton.

Finalement, même si l'urine de femelle allaitante est potentiellement répartie sur les tétines à la suite des auto-léchages, il est clairement apparu que ce substrat n'est pas impliqué dans l'expression initiale de la réponse de tétée, aussi bien chez le raton (Teicher & Blass, 1976) que chez le souriceau (section II.2). En se basant sur la littérature, nous pouvons penser que ce fluide est plutôt engagé dans la régulation des relations sociales intraspécifiques à un stade plus avancé du développement, notamment au cours de la maturation sexuelle et de la sélection d'un partenaire sexuel (e.g., Keller et al., 2008; Moncho-Bogani et al., 2002; Roberts et al., 2010).

Pour conclure, les résultats obtenus chez la souris et le rat montrent des similarités, mais également des spécificités dans l'initiation et la régulation de la recherche/saisie de la tétine. Cependant, les données collectées chez le raton sont trop éparses, en termes de substrats et d'âges testés, pour que l'on puisse sérieusement conclure sur d'éventuelles spécificités de chacune des espèces. Des travaux devraient donc être menés dans le but de compléter (lait de ratte, salive infantile chez des ratons inexpérimentés) et de confirmer les résultats obtenus chez le rat.

1.2.2.3) Autres mammifères

De façon générale, il convient de noter que les travaux conduits chez les autres espèces de mammifères ont examiné le pouvoir activateur d'un nombre limité de substrats olfactifs sur des nouveau-nés à des âges précis. Peu d'études longitudinales ont ainsi été réalisées (voir références citées dans la **Figure 33**). Malgré ces connaissances très incomplètes, certains substrats olfactifs sont apparus actifs pour initier le premier guidage olfactif vers la tétine. Tout comme les souriceaux et les ratons, les nouveau-nés des autres espèces de mammifères réagissent positivement, et de façon équivalente, lorsqu'ils sont exposés simultanément aux fluides amniotique et lacté. Par contre, aucune étude n'a, à notre connaissance, étudié la valeur biologique de la salive maternelle et infantile dans le contexte de tétée chez les nouveau-nés d'autres espèces que le rat et la souris (chez le lapin, le mouton, le porc ou le nouveau-né humain). Toutefois, il a été démontré que certaines espèces sont pourvues de glandes spécialisées qui produisent des sécrétions ayant comme fonction d'éveiller et d'attirer le jeune vers la région mammaire, et enfin, d'induire la mise en bouche et la succion d'une tétine. La nature de ces glandes et sécrétions varient selon les espèces : sécrétions des glandes de Montgomery produites par la femme, cire inguinale produite par la brebis, et la phéromone mammaire produite par la lapine.

Substrats Espèces	Liquide Amniotique	Colostrum /Lait	Salive maternelle	Salive infantile	Sécrétions des glandes mammaryes	Fèces	Références
1) Souris 	P0 à P2 saisie orale	P0 à P1 saisie orale	P0+ à P1 saisie orale	P1 saisie orale	?	P19-20 attraction	Al Ain et al. (sous presse a) Breen & Lehner (1977) Kodama (1990) Logan et al. (2012)
2) Rat 	P0 saisie orale	P7-8 saisie orale: INACTIF	P0 saisie orale	P2 saisie orale	?	P14-28 Attraction Ingestion	Blass & Teicher (1980); Leon (1974); Leon & Moltz (1972); Moltz & Lee (1983); Pedersen & Blass, (1981); Singh & Hofer (1976); Teicher & Blass (1976; 1977)
3) Lapin 	P0 Attraction	P0, P2 à P8 Recherche saisie orale	?	?	?	P1 à P8 Attraction Ingestion	Coureaud et al. (2001; 2002) Keil et al. (1990) Moncombe et al. (2005) Schaal et al. (2003)
4) Humain 	P0 à P3 Attraction	De 30 semaines de gestation, P0 à P4 Orientation Activation orale	?	?	Gl. de Montgomery P3 Attraction saisie orale	---	Bingham et al. (2003) Doucet et al. (2009) Marlier & Schaal (2005) Marlier et al. (1997)
5) Porc 	P0 Attraction	P0 Attraction	?	?	?	P0+ (12h), P1, P3, P7 Attraction	Morrow-Tesch & GcGlone (1990) Parfet & Gonyou (1991)
6) Mouton 	P0	P0	?	?	Gl. Inguinale P0	?	Schaal et al. (1995b) Vince & Ward (1984) Vince & Billing (1986)

Figure 33. Caractérisation des substrats odorants présents sur la tétine/mamelle de femelles allaitantes qui sont actifs pour le nouveau-né/jeune mammifère, en termes d'attraction et d'induction de la saisie orale: 1) la souris, 2) le rat, 3) le lapin, 4) l'humain, 5) le porc et 6) le mouton. Les substrats examinés sont : le liquide amniotique, le colostrum/lait, la salive maternelle, la salive infantile, les sécrétions des glandes mammaires et les fèces.

2) IDENTIFICATION DES PROCESSUS PSYCHOBIOLOGIQUES QUI INTERVIENNENT DANS LE COMPORTEMENT DE TETEE

Les résultats obtenus dans la section II.2 soulèvent plusieurs questions : Comment et pourquoi des individus dépourvus de toute expérience de tétée (mais ayant été soumis à des léchages maternels) sont-ils attirés par les odeurs de **liquide amniotique** et de **colostrum/lait murin**? De quelle façon les odeurs des **salives maternelle et infantile** acquièrent-elles le pouvoir d'induire la tétée chez les souriceaux après au moins une expérience de tétée ? La **Figure 34** illustre la nature des processus qui régulent potentiellement la réponse adaptative de tétée chez les mammifères en général, et la souris en particulier, et dans quelle mesure ces derniers contribuent à renforcer la similarité chimiosensorielle entre les environnements prénatal et postnatal. Ces différents processus peuvent opérer en synergie.

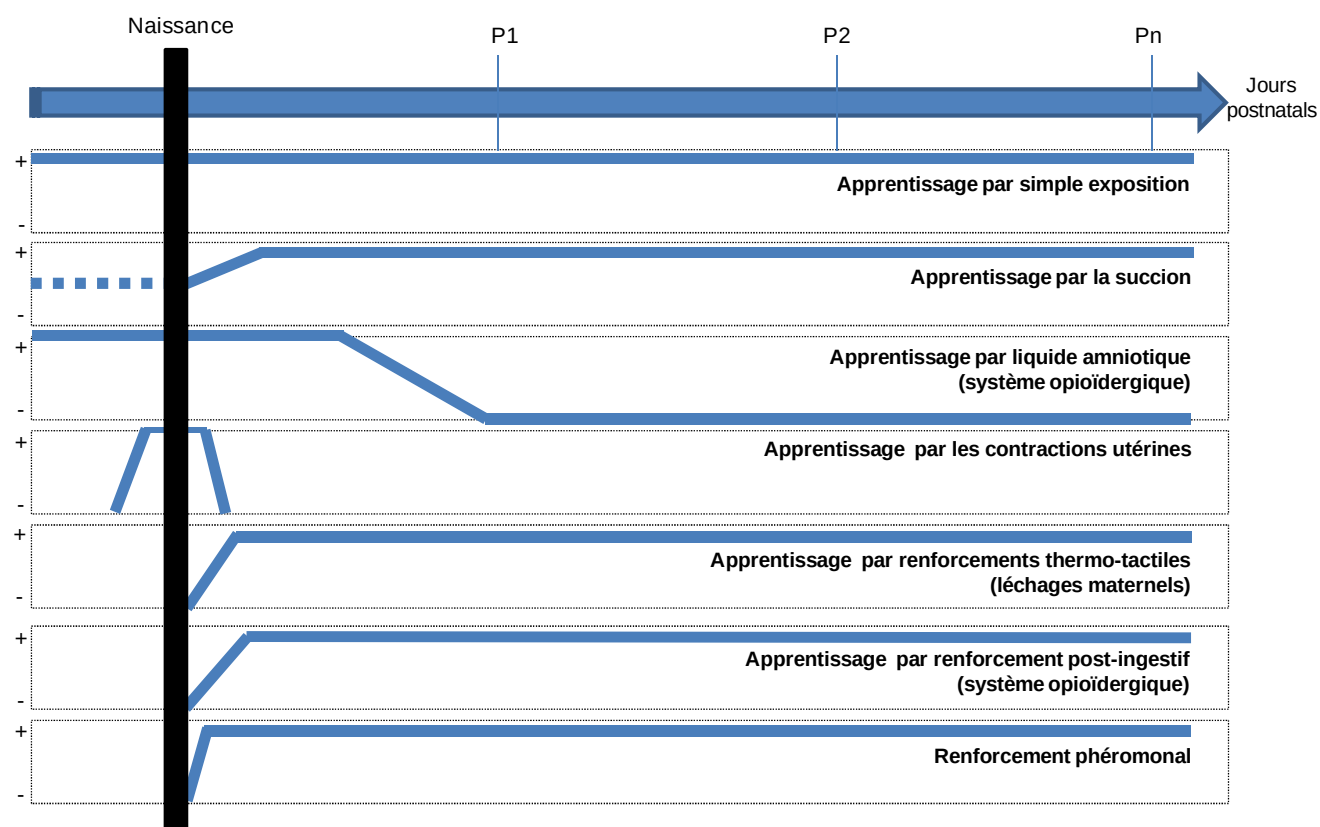


Figure 34. Identification des processus psychobiologiques qui interviennent potentiellement dans l'acquisition des réponses positives aux odorants dans les environnements prénatal et postnatal (d'après Schaal, 2005).

2.1) Stimuli inducteur de la première tétée chez la souris

Le liquide amniotique. La reconnaissance postnatale du liquide amniotique sous-entend que ses caractéristiques ont été apprises et mémorisées au cours de la vie intra-utérine par des processus de familiarisation *in utero* et/ou de conditionnement associés à des événements périnataux renforçants, conférant au liquide amniotique le pouvoir d'initier la première tétée. Ce processus de continuité chimiosensorielle transnatale a été mis en évidence chez plusieurs espèces de mammifères (souris : Logan et al., 2012 ; rat : Alberts & Ronca, 2012 ; Pedersen & Blass, 1982; lapin : Coureaud et al., 2002; mouton et rat : Schaal & Orgeur, 1992 ; humain : Schaal, 2005). *Premièrement*, le fœtus peut encoder passivement les propriétés chimiosensorielles du liquide amniotique puis rechercher cet élément familier dans l'environnement aérien. *Deuxièmement*, l'activité orale couplée à la sensation du liquide amniotique induit l'activation opioïdérique chez le fœtus en fin de gestation; la proprioception de l'activité orale pourrait également stimuler l'acquisition des composés olfactifs du liquide amniotique (rat : Robinson & Mendez-Gallardo, 2010 ; Korthank &

Robinson, 1998 ; humain : Kubota et al., 1989, cité dans Schaal, 2005). *Troisièmement*, au cours de la mise bas, les contractions utérines provoquent un niveau d'activation maximale chez le fœtus, favorisant ainsi l'actualisation de la signature olfactive du liquide amniotique (rat : Chotro & Molina, 1990 ; Ronca & Alberts, 1994 ; Wilson & Sullivan, 1994). Enfin, *quatrièmement*, le liquide amniotique se retrouve sur l'ensemble de l'abdomen de la mère et sur ses tétes suite à l'auto-léchage de la mère pendant et après la mise-bas. Les indices olfactifs véhiculés par le liquide amniotique pourront donc être appris dans les premiers instants suivant la naissance, grâce à des renforcements thermo-tactiles liés à la mère (chaleur, contact physique, léchages) (souris : Bollen et al., 2012 ; Bouslama et al., 2005). Ces différentes voies d'acquisition ont toutes les chances d'être redondantes et de jouer un rôle dans la consolidation de la mémoire fœtale.

Le colostrum. Deux mécanismes pourraient expliquer le fait que le colostrum a d'emblée le pouvoir d'induire la première tétée. *Premièrement*, ses propriétés chimiosensorielles sont alignées sur celles du liquide amniotique créant une certaine continuité chimiosensorielle transnatale. Les composés olfactifs communs aux deux fluides peuvent donc être détectés et utilisés par les nouveau-nés pour s'orienter dans l'environnement postnatal (Alberts & Ronca, 2012; Coureaud et al., 2002; Pedersen & Blass, 1982; Schaal, 2005; Schaal & Orgeur, 1992). *Deuxièmement*, le colostrum pourrait contenir un ou des composés induisant la réponse prédisposée de tétée chez des nouveau-nés inexpérimentés. Mais à cette date, un tel processus n'a été démontré que chez la lapine, dont le lait véhicule un composé qui à lui seul explique le pouvoir attractif du colostrum/lait (Schaal et al., 2003, 2009; Coureaud et al., 2010).

2.2) Stimuli inducteurs du comportement de tétée après expérience néonatale

L'implication des odeurs salivaires dans l'induction de la tétée dépend de processus d'apprentissage (sections II.2 et II.3). Les résultats préliminaires obtenus dans la section II.3 suggèrent ainsi qu'une exposition à un odorant neutre (pendant 2 x 2 h au cours des premières 24 h de vie) n'a pas le pouvoir d'induire la saisie de la tétine lorsque celui-ci est déposé sur une tétine neutre de femelle non allaitante. Cependant, ce même odorant, associé à une expérience de tétée dans les mêmes conditions temporelles, acquiert ce pouvoir. Nombre d'études ont mis en lumière la capacité des nouveau-nés de Mammifères à associer une odeur neutre au contexte renforçant de la tétée maternelle (souris : Armstrong et al., 2006; rat : Miller & Spear, 2008 ; lapin : Coureaud et al., 2006 ; humain : Delaunay-El Allam et al., 2010 ; Sullivan et al., 1991b), permettant à l'individu d'optimiser sa capacité à téter. Dès la

première expérience de tétée, plusieurs processus peuvent opérer pour stimuler les apprentissages olfactifs précoces. *Premièrement*, les mécanismes de renforcement post-ingestif et post-absorptif permettent au nouveau-né d'actualiser la signature olfactive du colostrum et de tout type de substrats associés (rat : Johanson & Hall, 1979, 1982 ; Cheslock et al., 2000, 2004). *Deuxièmement*, les stimulations orales associées à la succion (même sans ingestion) constituent un puissant renforcement qui favorise le développement de préférences olfactives stables chez le nouveau-né (rat : Blass, 1990 ; Brake, 1981 ; lapin : Hudson et al., 2002 ; mouton : Val-Laillet et al., 2006). Enfin, *troisièmement*, les renforcements thermo-tactiles peuvent agir tout au long du développement postnatal (souris : Bouslama et al., 2005 ; Bollen et al., 2012).

2.3) Présence d'un signal olfactif chez la souris?

A cette date, nos recherches et celles d'autres équipes (Logan et al., 2012) ne permettent pas de conclure à l'existence d'un mécanisme phéromonal dans l'allaitement chez la souris, à l'instar de celui décrit chez le lapin. En tout cas, le lait murin ne semble pas véhiculer un tel signal à destination du souriceau, et les salives maternelles et infantiles sont de toute évidence acquises par association avec la tétée. Il faut souligner que les conditions d'interaction de la lapine et des lapereaux sont aux antipodes de celles de la souris et de sa portée. Chez le lapin, les comportements maternels se résument à un allaitement unique de 3-5 min par jour obligeant les lapereaux à être très réactifs et efficaces pour saisir une tétine et téter dans un contexte de forte compétition (Coureaud et al., 2000; Hudson & Distel, 1982; Zarrow et al., 1965). La phéromone mammaire est ainsi un agent de facilitation de l'éveil comportemental des lapereaux, et fonctionne comme un « ordre » de saisie d'une tétine dans les 15 secondes (Hudson & Distel, 1983). Au sein de cette structure sociale mère-jeunes extrêmement contrainte, elle confère un avantage adaptatif évident. De plus, la phéromone mammaire est un agent de renforcement qui induit un conditionnement olfactif actif lors de la prochaine tétée (Coureaud et al., 2006a).

Chez la souris, l'existence d'une molécule phéromonale ayant une fonction d'éveiller et de stimuler la recherche de la tétine pourrait être contre-productif pour les souriceaux, alors que la mère est accessible en quasi-permanence. Néanmoins, l'existence d'un signal phéromonal inducteur de la tétée pourrait ainsi conférer un avantage adaptatif chez les rongeurs en assurant le maintien de la tétine en bouche. Chez le rat, l'éjection lactée a lieu toutes les 15 min pendant environ 6 secondes au cours de phase de sommeil profond (Voloschin & Tramezzani, 1979; Lincoln et al., 1980). Pour s'adapter à une délivrance de colostrum/lait

aussi brève et fréquente, les nouveau-nés rongeurs restent « attachés » en permanence à une tétine et l'émission d'un signal odorant concomittant à l'éjection pourrait déclencher des réponses automatiques d'ajustement oral sur la tétine. Mais à ce jour, nous n'avons pu collecter de données exploitables ou relever d'informations fiables sur le rythme temporel d'éjection/ingestion du colostrum/lait au cours de la période de lactation chez la souris. Les travaux chez le raton, qui se développent dans des conditions voisines de celles des souriceaux, ont notamment mis en évidence un signal fortement attractif dans la salive, le diméthyle disulfure (Pedersen & Blass, 1981). Ce composé favorise la prise en bouche de la tétine par le nouveau-né et s'avère déjà actif en ce sens chez le fœtus en fin de gestation (Smotherman & Robinson, 1992).

En résumé, chez la souris, l'initiation de la tétée va être contrôlée par l'action de processus de conditionnements olfactifs périnataux opérant de façon conjointe. L'existence d'un processus de signalisation prédisposé n'est cependant pas à exclure, même si nos résultats actuels et ceux de Logan et al. (2012) ne permettent pas de mettre en avant un tel mécanisme dans l'induction de la tétée du souriceau. Il ne faut pas omettre que dans le cas du lapin, les mécanismes prédisposés sont intimement mêlés à de multiples mécanismes d'apprentissage par familiarisation et conditionnement (Schaal et al., 2009).

3) COVARIATION ENTRE PROPRIETES SENSORIELLES DU LAIT MURIN ET PREFERENCE OLFACTIVE DU SOURICEAU

La section III de ces travaux de thèse a, tout d'abord, mis en évidence que les souriceaux BALB/c entre P0 et P15 sont attirés par l'odeur de laits murins recueillis à différents stades de lactation. A nouveau, ces données indiquent que le colostrum/lait véhicule des composés volatils attractifs pour des souriceaux sans qu'aucune exposition préalable ne soit nécessaire. Ce résultat s'oppose à ceux obtenus par Logan et al. (2012), qui soutiennent que ce fluide est éthologiquement inactif pour des souriceaux inexpérimentés. Comme mentionné plus haut, cette divergence peut s'expliquer par des différences méthodologiques (en particulier, les méthodes de traite et de conservation du lait jusqu'au test que l'article sus-cité ne permet pas d'évaluer).

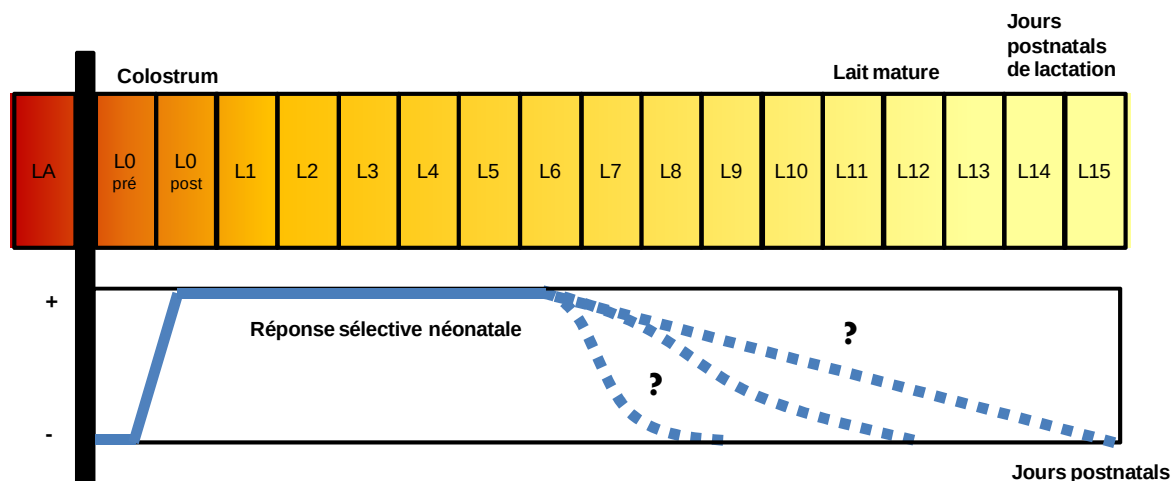


Figure 35. Propriétés chimiosensorielles du lait et préférence olfactive du souriceau au cours du développement. Dans la partie haute de la figure, la similarité chimiosensorielle relative entre le liquide amniotique, le colostrum et les laits de débuts et de fin de lactation a été représentée avec un gradient colorimétrique : les couleurs similaires indiquent un fort chevauchement du profil olfactif des différents substrats et inversement. La partie basse de la figure représente les variations de la réponse sélective du nouveau-né à l'égard des odeurs de laits prélevés à des stades de lactation différents.

De plus, nous avons mis en lumière un mécanisme encore peu exploré chez les mammifères : l'existence de réponses sélectives des nouveau-nés à l'égard du lait en fonction du stade de lactation auquel il est obtenu (**Figure 35**). D'une part, les souriceaux âgés de P0+ (8-15h avec une brève expérience de tétée), P2 et P6 ont des réponses d'appétence envers l'odeur de laits prélevés à des stades de lactation précoces par comparaison à des laits de périodes de lactation plus avancées. Cette sélectivité des souriceaux BALB/c pour les odeurs de laits précoces BALB/c se généralise également au lait de femelles d'une autre souche (section III.3). Les souriceaux BALB/c de 2 jours discriminent olfactivement entre les laits L2 et L15 de la souche C57BL/6 et explorent plus le lait précoce L2. De plus, les souriceaux BALB/c sont également sélectifs envers les odeurs de tétines de femelles allaitantes (BALB/c), en saisissant préférentiellement celles des femelles d'âges lactationnels les plus précoces.

Ces réponses différentielles des nouveau-nés mettent en lumière que le lait présente au moins trois profils olfactifs différents au cours de la période de lactation (**Figure 35**): 1) la première période de lactation se situe au cours du premier jour postnatal (de 0 à 15 h postpartum) ; 2) la seconde période désigne les stades de lactation précoces (du 2^{ème} au 6^{ème} jours postpartum) ; et enfin 3) la troisième période concerne les stades de lactation intermédiaires/tardifs (débutant entre le 7^{ème} jour et le 15^{ème} jour postpartum).

Comment peut-on expliquer que des laits collectés en début de lactation émettent des odeurs plus attractives que des laits de lactation tardive pour des souriceaux d'âges précoces et déjà expérimentés à la tétée ? Une première hypothèse voudrait que des composés volatils actifs soient émis en plus grande quantité en début qu'en fin de lactation pour favoriser l'accès à la tétine et l'ingestion de colostrum. Ce phénomène peut concerner des arômes alimentaires qui pourraient être plus concentrés dans le colostrum que dans le lait mature, ou alors des composés à valeur spécifique de signalisation olfactive (Coureaud et al., 2006b; Schaal et al., 2003). Une deuxième hypothèse se réfère au fait que les souriceaux préfèrent les odeurs de laits collectés à des stades de lactation auxquels ils ont déjà été confrontés. Suite à des renforcements nombreux et variés, les nouveau-nés seraient capables, dès la première expérience de tétée, de percevoir la signature olfactive du lait et de la mémoriser tout au long de la période de lactation (Armstrong et al., 2006; Bouslama et al., 2005; Durand et al., 2003; Mainardi et al., 1965).

D'autre part, des souriceaux à d'autres stades du développement ont exprimé une exploration non sélective à l'égard de laits présentant des profils olfactifs différents: les souriceaux P0 (4-6 h de vie postnatale, sans expérience de tétée) et P15. Les souriceaux P0 explorent de façon équivalente les effluves de laits L0 et L15. Cette réponse non sélective pourrait être liée soit à l'immaturité du système chimioréceptif en termes de discrimination. Toutefois, plusieurs études montrent une aptitude de discrimination olfactive chez de très jeunes nouveau-nés après une exposition directe, même très brève, aux odeurs (Alberts & May, 1984; Caza & Spear, 1984; Miller & Spear, 2008, 2010). Néanmoins, la nécessité d'une telle exposition peut paraître contradictoire avec la notion de continuité olfactive transnatale, l'odeur du colostrum constituant en quelque sorte un rappel de l'odeur amniotique. Mais, effectivement, chez le raton, pour qu'un odorant présent *in utero* devienne apte à engager la saisie d'une tétine, il doit préalablement avoir été rencontré *ex utero* en association avec d'autres agents de renforcement maternels (léchages) (Perdersen & Blass, 1982). Par ailleurs, les réponses apparemment indistinctes des souriceaux P0 pourraient être dues à l'état de faim qui leur est imposé dès la naissance donnant lieu à des états de motivation intenses commandant des réponses indiscriminées.

De même, les souriceaux de P15, sensoriellement plus matures et expérimentés à la tétée, explorent autant les odeurs de laits L2, L6 que L15. Ces souriceaux plus âgés, pourraient, à l'inverse des plus jeunes, exprimer une motivation réduite à approcher l'odeur de lait au cours

d'une période où ils commencent à ingérer des aliments solides, reflétant ainsi les prémisses du sevrage. Par ailleurs, les souriceaux de P15 ont déjà consommé les laits L2, L6 et L15 au cours de leur développement, assignant à ces odeurs lactées un niveau identique de familiarité et d'appétence. L'absence observée de préférence olfactive envers des différents laits chez les souriceaux de P15 peut aussi trouver une explication du côté du fonctionnement chimiosensorielle. Au fur et à mesure que les nouveau-nés grandissent, leurs besoins vitaux changent et la valence du lait se transforme corrélativement. De tels exemples de variations ou d'inversions hédoniques d'odeurs au cours du développement sont fréquents chez les rongeurs. Chez la **souris domestique**, les souriceaux de P10 sont attirés par l'odeur de litière (convoyant l'urine et fèces) de leur mère par rapport à une litière de femelle non allaitante et non familière, mais cette préférence s'inverse à l'âge de 14 jours (Thomas et al., 2010). De la même façon, chez la **souris épineuse** (*Acomys cahirinus*), les souriceaux de P15 et P20 préfèrent explorer la litière de femelles allaitantes que de femelles non allaitantes, alors que cette préférence s'inverse à l'âge de 25 jours, tandis que les souriceaux de P2 sont toujours attirés par les odeurs maternelles de femelles de 35-38 jour postpartum (Porter et al., 1978). Des telles variations des préférences olfactives ont été aussi rapportées chez le rat, où les **ratons** de 14 jours sont attirés par l'odeur des fèces chargées de « phéromone maternelle », alors qu'à 8 jours de vie, les ratons n'y sont pas sensibles (Moltz & Lee, 1983). La réponse comportementale néonatale est synchronisée avec l'émission de la phéromone maternelle au 14^{ème} jour postpartum, et elle décroît progressivement jusqu'à disparaître autour du 21-23^{ème} jour. Un phénomène comparable a été décrit chez le **lapereau** exposé à une concentration fixe de phéromone mammaire. La réponse de recherche/saisie est maximale entre 0 et 9 jours de vie (90-100%), puis diminue au 10-11^{ème} jours de vie, pour disparaître complètement vers le 28^{ème} jour (Coureaud et al., 2008).

D'une façon générale, les nouveau-nés de mammifères expriment des réponses préférentielles envers les odeurs maternelles et le lait adapté à leur âge, tandis que les individus plus âgés approchant du sevrage apparaissent moins sensibles et/ou moins sélectifs envers les odeurs lactées ou maternelles. Ces changements physiologiques et comportementaux favorisent la transition entre l'alimentation lactée et post-lactée permettant l'adaptation à la nouvelle niche ingestive de l'alimentation typique des adultes de son espèce.

4) PERSPECTIVES

Notre recherche a contribué à compléter les connaissances sur la communication chimique mise en jeu dans les interactions mère-jeunes chez la souris de laboratoire. Elle a permis d'ouvrir plusieurs perspectives de recherches portant sur : 1) Les odorants qui déclenchent le comportement de tétée ; 2) L'implication de l'odeur du lait dans les apprentissages olfactifs néonataux ; 3) La composition chimique du lait murin et sa variation au cours de la lactation, 4) La généralisation des processus chimiosensoriels à l'espèce souris ; 5) Le rôle des émissions chimiosensorielles néonatales dans la réalisation du comportement maternel ; et 6) la caractérisation des mécanismes analogues chez le modèle humain.

4.1) Les odorants qui déclenchent la tétée

L'identification de substrats mammaires qui facilitent la saisie de la tétine par les souriceaux demande à être complétée dans deux directions: le rôle potentiel de substrats non considérés dans cette recherche et l'effet des interactions entre les substrats.

Dans nos conditions expérimentales, seulement 50-55% des nouveau-nés de P0 se sont montrés réactifs à l'odeur du liquide amniotique et du colostrum, alors que 91% l'ont été envers l'odeur de tétine de femelle allaitante. Avec notre approche, nous ne sommes pas parvenus à reproduire le potentiel réactogène des stimulations olfactives qui opèrent dans les conditions naturelles de tétée. Il serait tout à fait possible qu'une autre substance, non examinée ici, puisse jouer un rôle dans le comportement de tétée du souriceau, comme par exemple, les sécrétions des glandes sébacées de la tétine. Les tétines murines sont en effet pourvues de glandes sébacées apicales qui augmentent en nombre et en taille à partir du 17^{ème} jour de gestation jusqu'au 18^{ème} jour de lactation (Koizumi et al., 2003). Ces variations sont peut-être corrélatives de la production/excrétion de sécrétions dont on peut à présent évaluer l'efficacité.

Les réponses de saisie modérées des souriceaux envers nos substrats candidats pourraient également s'expliquer par le fait que ceux-ci aient été présentés séparément. Le fait de fractionner les mélanges odorants a pour effet de réduire leur activité comportementale (Müller-Schwarze, 2006; Müller-Schwarze & Houlihan, 1991). Or, des réactions chimiques pourraient se produire entre fractions d'un mélange biologique. Par exemple, l'activité enzymatique de la salive accélère la libération de molécules volatiles provenant de mélanges alimentaires complexes (Büttner, 2002). Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer l'effet

de la mise en mélange de substrats biologiques sur les réponses des souriceaux. Par exemple, le profil odorant de l'effluve du lait ou du liquide amniotique pourrait être notablement modifié par un ajout de salive maternelle ou infantile.

La connaissance des mécanismes olfactifs mis en jeu dans les comportements initiaux de tétée peuvent ensuite être appliqués à la compréhension des troubles sensoriels et comportementaux chez des souches présentant des troubles alimentaires précoces suites à des manipulations génétiques. Par exemple, l'absence du gène *Magel2* entraîne chez le souriceau des troubles sévères de la succion : les souriceaux ne tètent pas et meurent dans les 24h suivant la naissance (Schaller et al., 2010). Comme le canal olfactif participe à l'initiation du comportement de tétée, nous pouvons supposer que la détection et/ou le traitement de l'information chimiosensorielle émise par la mère pourrait être altérés chez ces nouveau-nés.

4.2) L'implication de l'odeur du lait dans les apprentissages olfactifs néonataux

Le contexte de tétée englobe de nombreux facteurs de renforcement, comme la présence de la mère, la chaleur, l'ingestion de lait, l'odeur de lait. Parmi ces stimulations, l'odeur du lait porte, à elle seule, des effets renforçants notables puisqu'elle induit les réponses pré-ingestives et ingestives du souriceau dès les premières heures de vie. Présentée de façon isolée des autres stimulations renforçantes associées au contexte de tétée, l'odeur du lait pourrait donc suffire à stimuler les apprentissages olfactifs précoces. Les mécanismes sous-jacents au pouvoir réactogène du lait pourraient dépendre de processus d'apprentissage olfactif extrêmement rapide s'exerçant chez le nouveau-né, ou encore d'acquisitions prénatales.

4.3) Composition chimique du lait murin au cours de la lactation

Nos travaux ont révélé que les souriceaux BALB/c détectent les variations du profil olfactif du lait de femelles BALB/c au cours de la lactation. Les souriceaux d'âges précoces (mais ayant eu une brève expérience de tétée) sont plus fortement attirés par l'odeur du lait de début de lactation. Cette sélectivité envers les odeurs de lait « précoce » est observée également pour le lait d'une autre souche (C57BL/6). Aucune étude n'ayant, à ce jour, caractérisé le profil olfactif du lait murin au cours de la lactation, ces données sont difficiles à interpréter. Seules des recherches sur la composition nutritive et biochimique du lait murin ont été réalisées. Le potentiel « informatif » du lait, en particulier à travers des composés odorants ou sapides, n'a à ce jour pas été envisagé chez la souris comme il a pu l'être chez l'espèce humaine ou le lapin. Une perspective prometteuse de ce travail serait donc de comprendre la

composition de l'odeur qui émane du lait murin et d'identifier la fraction volatile invariante en fonction de fluctuations environnementales ou de variations génétiques. L'immense variabilité génétique de la souris (e. g., souches consanguines, KO, transgéniques) peut, à cet égard, en faire un modèle de choix pour l'analyse des liens entre gènes, signaux odorants et comportements néonataux.

4.4) Généralisation des processus chimiosensoriels à l'espèce souris

Peut-on généraliser les mécanismes chimiosensoriels mis en évidence dans cette recherche sur les souriceaux issus de la souche de laboratoire BALB/C à la totalité de l'espèce souris. En d'autres termes, nos résultats sont-ils représentatifs de l'espèce *Mus musculus domesticus* ou sont-ils spécifiques à la souche de laboratoire étudiée dans des conditions particulières?

Par exemple, la covariation entre les propriétés chimiosensorielles du lait/de la tétine maternelle et les capacités sensorielles des souriceaux reste peu abordée chez les mammifères. Chez le lapin, il a démontré que les lapereaux domestiques présentent la même réponse que les lapereaux de nombreuses souches, y compris ceux de type sauvage, lorsqu'ils étaient exposés à la phéromone mammaire (Coureaud et al., 2008). En revanche, les levreaux n'y réagissent pas (Schaal et al., 2003). Ces résultats mettent en lumière un mécanisme de covariation entre émissions chimiosensorielles de la lapine et capacités sensorielles des lapereaux.

De futures études devraient utiliser l'avantage de la variabilité génétique de la souris pour évaluer la généralisabilité des mécanismes identifiés chez la souche BALB/c. L'étude de la nature des substrats impliqués dans l'induction des réponses néonatales pré-ingestives et ingestives et de la réactivité sélective des souriceaux face aux odeurs de laits de différents âges pourrait être abordée en examinant les réponses comportementales des souriceaux issus d'autres souches de laboratoire (C57BL/6, ...) et de souches sauvages.

4.5) Les émissions chimiosensorielles néonatales régulatrices des comportements maternels

Ayant focalisé notre intérêt sur le nouveau-né au cours de cette thèse, les questions réciproques sur le rôle des odeurs néonatales dans le comportement maternel n'ont pas manqué de surgir. Chez les mammifères, les signaux chimiques émis par la progéniture sont à la base de l'attraction maternelle et de la réciprocité de la relation mère-jeunes (Keller & Lévy, 2009). On connaît l'importance des vocalisations ultrasonores du souriceau dans l'approche, le ramené au nid ou l'expression de soins maternels spécifiques (Crawley, 2000 ;

Ehret & Bernecker, 1986 ; Weber & Olsson, 2008). La nature des odeurs infantiles impliquées dans les interactions mère-jeunes reste par contre mal connue chez la souris. Chez le rat, le dodécyl propionate a ainsi été identifié dans les sécrétions préputiales des ratons pour induire le léchage de la mère favorisant la miction néonatale (Brouette-Lahlou et al., 1991a ;b). Par conséquent, des futures recherches devraient décrypter les processus chémiochimiques qui stimulent l'attention de la mère, favorisent la recherche et le contact avec ses nouveau-nés et déclenchent les léchages et les positions d'allaitements.

4.6) Le modèle souris : Modélisation des phénomènes liés à la naissance prématurée chez le nourrisson

Les enjeux ultimes de nos questionnements sont de mieux appréhender les mécanismes sensoriels et cognitifs régissant le comportement de tétée chez les mammifères dans le but d'optimiser les premières prises alimentaires, voire d'aider à la compréhension des troubles du comportement alimentaire fréquemment observés chez les nouveau-nés humains nés à terme ou prématurés (Mellier et al., 2008). Environ 8% des naissances annuelles sont prématurées en France (Goldenberg et al., 2009), dont un des plus fréquents troubles est l'incapacité à initier le comportement de tétée au sein maternel, voire même, toute activité d'ingestion orale autonome. Grâce à ses caractéristiques précoces, - capacités sensori-motrices limitées et incapacité à réguler leur température corporelle (Ehret, 1976; Weber & Olsson, 2008) -, le souriceau nouveau-né est souvent sélectionné par les néonatalogistes pour modéliser certaines conditions/phénomènes rencontré(e)s par les nouveau-nés humains nés prématurément (Armstrong et al., 2006; Bouslama et al., 2005 ; Elovitz & Mrinalini, 2004 ; Ratajczak & Muglia, 2008). Il convient cependant de noter que les nourrissons nés à terme ou prématurés possèdent des capacités auditives et visuelles beaucoup plus abouties que les souriceaux de quelques jours de vie postnatale.

Etudier le développement des capacités sensorielles et cognitives mis en jeu dans le comportement de tétée chez le souriceau peut, par conséquent, fournir des pistes de recherches pour mieux appréhender les phénomènes liés à la prématurité du nourrisson.

V) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Alberts, J. R. (1987). Early learning and ontogenetic adaptation. In: N. A. Krasnegor, E. M. Blass, M. A. Hofer, W. P. Smotherman (Eds.), *Perinatal development, a psychobiological perspective* (pp. 12-38). Orlando, FA: Academic Press.
- Alberts, J. R. (2008). The Nature of Nurturant Niches in Ontogeny. *Philosophical Psychology*, 21, 295–303.
- Alberts, J. R., & May, B. (1984). Nonnutritive, thermotactile induction of filial huddling in rat pups. *Developmental Psychobiology*, 17, 161–181.
- Alberts, J. R., & Cramer, C. P. (1988). Ecology and experience; sources of means and meaning of developmental change. E. M. Blass, (Ed.), *Handbook of behavioral neurobiology*, Vol. 9: Behavioral ecology and developmental psychobiology (pp. 1–39). New York, USA: Plenum Press.
- Alberts, J. R., & Ronca, A. E. (2012). The experience of being born: A natural context for learning to suck. *International Journal of Pediatrics*. doi:10.1155/2012/129328
- Allen, J. C. (1990). Milk Synthesis and Secretion Rates in Cows with Milk Composition Changed by Oxytocin. *Journal of Dairy Science*, 73, 975-984.
- Alleva, E., & Calamandrei, G. (1986). Odor-aversion learning and retention span in neonatal mouse pups. *Behavioral and Neural Biology*, 46, 348-357.
- Alvarez, A., & Sas, J. (1961). β -galactosidase changes in developing intestinal tract of the rat. *Nature*, 190, 826-827.
- Arakawa, H., Blanchard, D. C., Arakawa, K., Dunlap, C., & Blanchard, R. J. (2008). Scent marking behavior as an odorant communication in mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32, 1236-1248.
- Arias, C., & Chotro, M. G. (2007). Amniotic fluid can act as an appetitive unconditioned stimulus in preweanling rats. *Developmental Psychobiology*, 49, 139–149.
- Armstrong, C. M., DeVito, L. M., & Cleland, T. A. (2006). One-trial associative odor learning in neonatal mice. *Chemical Senses*, 31, 343–349.
- Atkinson, S. A., Bryan, M. H., & Anderson, G. H (1981). Human milk feeding in premature infants: Protein, fat, and carbohydrate balances in the first two weeks of life. *Journal of Pediatrics*, 99, 617-624.

B

- Baintner, K. (2007). Transmission of antibodies from mother to young: evolutionary strategies in a proteolytic environment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117, 153–161.
- Baker, H., Cummings, D. M., Munger, S. D., Margolis, J. W., Franzen, L., Reed, R. R., & Margolis, F. L. (1999). Targeted deletion of a cyclic nucleotide-gated channel subunit (OCNC1): biochemical and morphological consequences in adult mice. *The Journal of Neuroscience*, 19, 9313–9321.
- Baumans, V. (2004). The welfare of laboratory mice. In: Kaliste, E. (Ed.), *The Welfare of Laboratory Animals*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 119–152.

- Belluardo, N., Mudó, G., Campisi, A., Vanella, A., Russo, J., & Bindoni, M. (1993). Crossfostering and early development of natural killer cytotoxic activity in various inbred mouse strains. *Physiology and Behavior*, 53, 951-957.
- Bernt, K. M., & Walker, W. A. (1999). Human milk as a carrier of biochemical messages. *Acta Paediatrica Supplement*, 88, 27-41.
- Berry, R. J. (1970). The natural history of the house mouse. *Field Studies*, 3, 219-262.
- Berry, R. J., & F. H. Bronson. (1992). Life history and bioeconomy of the house mouse. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 67, 519-550.
- Bingham, P. M., Abassi, S., & Sivieri, E. (2003). A pilot study of milk odor effect on nutritive sucking by premature infants. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 157, 72-75.
- Bird, S., & Gower, D. G. (1983). Estimation of the odorous steroid, 5-androst-16-en-3-one, in human saliva. *Experientia*, 39, 790-792.
- Blass, E. M. (1990). Suckling: Determinants, changes, mechanisms, and lasting impressions. *Developmental Psychology*, 26, 520-533.
- Blass, E. M. (1996). Mothers and their infants: Peptide-mediated physiophysiological, behavioral, and affective changes during suckling. *Regulatory Peptides*, 66, 109-112.
- Blass, E. M., & Teicher, M. H. (1980). Suckling. *Science*, 210, 15-22.
- Blass, E. M., Teicher, M. H., Cramer, C. P., Bruno, J. P., & Hall, W. G. (1977). Olfactory, Thermal, and Tactile Controls of Suckling in Preauditory and Previsual Rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 91, 1248-1260.
- Block, M. L., Volpe, L. C., & Hayes, M. J. (1981). Saliva as a chemical cue in the development of social behavior. *Science*, 211, 1062-1064.
- Bollen, B., Bouslama, M., Matrot, B., D'Hooge, R., Van den Bergh, O., & Gallego, J. (2007). Learned defense response to hypoxia in newborn mice. *Neuroscience letters*, 420, 268-272.
- Bollen, B., Matrot, B., Ramanantsoa, N., Van den Bergh, O., D'Hooge, R., & Gallego, J. (2012). Olfactory classical conditioning in neonatal mouse pups using thermal stimuli. *Behavioural Brain Research*, 229, 250-256.
- Bouslama, M., Durand, E., Chauviere, L., Van den Bergh, O., & Gallego, J. (2005). Olfactory classical conditioning in newborn mice. *Behavioural Brain Research*, 161, 102-106.
- Bowers, J. M., & Alexander, B. K. (1967). Mice: individual recognition by olfactory cues. *Science*, 158, 1208-1210.
- Braastad, B. O. (1998). Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals. *Applied Animal Behaviour Science*, 61, 159-180.
- Brake, S. C. (1981). Suckling infant rats learn a preference for a novel olfactory stimulus paired with milk delivery. *Science*, 211, 506-508.
- Branchi, I. (2009). The mouse communal nest: investigating the epigenetic influences of the early social environment on brain and behavior development. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33, 551-559.
- Branchi, I., & Ricceri, L. (2002). Transgenic and knock-out mouse pups: growing need for behavioral analysis. *Genes, Brain and Behavior*, 1, 135-141.
- Branchi, I., Santucci, D., Vitale, A., & Alleva, E. (1998). Ultrasonic vocalizations by infant laboratory mice: a preliminary spectrographic characterization under different conditions. *Developmental Psychobiology*, 33, 249-256.

- Branchi, I., Santucci, D., & Alleva, E. (2001). Ultrasonic vocalisation emitted by infant rodents: a tool for assessment of neurobehavioural development. *Behavioural Brain Research*, 125, 49–56.
- Breen, M. F., & Leshner, A. I. (1977). Maternal pheromone: a demonstration of its existence in the mouse (*Mus musculus*). *Physiology and Behavior*, 18, 527–529.
- Brennan, P. A., & Peele, P. (2003). Towards an understanding of the pregnancy-blocking urinary chemosignals of mice. *Biochemical Society Transactions*, 31, 152–155.
- Bridges, R. S. (1998). The genetics of motherhood. *Nature Genetics*, 20, 108–109.
- Bronson, F. H., Dagg, C. P., & Snell, G. D. (1966). Reproduction. In: Green, E.L. (Ed.), *Biology of the Laboratory Mouse*. McGraw-Hill, New York, pp. 187–204.
- Bronstein, P. M., Levine, M. J., & Marcus, M. (1975). A rat's first bite: the nongenetic, cross-generational transfer of information. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, 89, 295–298.
- Brouette-Lahlou, I., Amouroux, R., Chastrett, I., Cosnier, J., Stoffelsma, J., & Vernet-Maury, E. (1991a). Dodecyl propionate, the attractant from rat pups preputial gland, characterization and identification. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 1343–1354.
- Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., & Chanel, J. (1991b). Is rat dam licking behavior regulated by pups' preputial gland secretion? *Animal Learning and Behavior*, 19, 177–184.
- Brown, R. E. (1979). Mammalian social odors: a critical review. *Advances in the Study of Behavior*, 10, 103–162.
- Brown, R. E., & Macdonald, D. W. (1985). *Social Odours in Mammals*. Vols 1 & 2. Oxford: Clarendon Press.
- Brown, J. R., Ye, H., Bronson, R. T., Dikkes, P., & Greenberg, M. E. (1996). A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene *fosB*. *Cell*, 86, 279–309.
- Bruce, H. M. (1959). An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature*, 184, 105.
- Brumley, M. R., & Robinson, S. R. (2010). Experience in the perinatal development of action systems. In Blumberg, M. S., Freeman J. H., & Robinson, S. R. (Eds.). *Oxford handbook of developmental behavioral neuroscience*. Pp. 181–209. Oxford University Press, New York.
- Brunet, L. J., Gold, G. H. & Ngai, J. (1996). General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Neuron*, 17, 681–693.
- Buettner, A. (2007). A selective and sensitive approach to characterize odour-active and volatile constituents in small-scale human milk samples. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 465–473.
- Burton, J. C., Shuster, S., Carlidge, M., Libman, L. J., & Martell, V. (1975). Lactation, sebum excretion, and melanocyte-stimulating hormone. *Nature*, 243, 349–350.
- Büttner, A. (2002). Influence of human saliva on odorant concentrations. 2. Aldehydes, alcohols, 3-alkyl-2-methoxypyrazines, methoxyphenols, and 3-hydroxy-4,5-dimethyl-2(5H)-furanone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7105–7110.



- Camp, L. L., & Rudy, J. W. (1988). Changes in the categorization of appetitive and aversive events during postnatal development of the rat. *Developmental Psychobiology*, 21, 25–42.

- Carrier, M., Roubertoux, P., & Cohen-Salmon, C. (1983). Early development in mice. I: genotype and post-natal maternal effects. *Physiology and Behavior*, 30, 837–844.
- Caza, P. A., & Spear, N. E. (1984). Short-term exposure to an odor increases its subsequent preference in preweanling rats: A descriptive profile of the phenomenon. *Developmental Psychobiology*, 17, 407–422.
- Cheslock, S. J., Varlinskaya, E. I., Petrov, E. S., & Spear, N. E. (2000). Rapid and robust olfactory conditioning with milk before suckling experience: promotion of nipple attachment in the newborn rat. *Behavioral Neuroscience*, 114, 484–495.
- Cheslock, S. J., Sanders, S. K., & Spear, N. E. (2004). Learning during the newborn's first meal: special resistance to retroactive interference. *Developmental Science*, 7, 581–598.
- Cheung, C. Y., & Brace, R. A. (2005). Amniotic fluid volume and composition in mouse pregnancy. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 12, 558–562.
- Choleris, E., Guo, C., Liu, H. F., Mainardi, M., & Valsecchi, P. (1997). The effect of model age and number on duration of socially-induced food preferences in house mouse (*Mus domesticus*). *Behavioural Processes*, 41, 69–77.
- Chotro, M. G., & Molina, J. C. (1990). Acute ethanol contamination of the amniotic fluid during gestational day 21: Postnatal changes in alcohol responsiveness in rats. *Developmental Psychobiology*, 23, 535–547.
- Clough, G. (1982). Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biological Reviews*, 57, 487–523.
- Conti, C. J., Gimenez-Conti, I. B., Benavides, F., Frijhoff, A. F. W., & Conti, M. A. (2004). Atlas of laboratory mouse histology. Texas Histopages, <http://ctrngenpath.net/static/atlas/mousehistology/Windows/femaleu/mousemammgldiagram.html>
- Coopersmith, R., Henderson, S. R., & Leon, M. (1986). Odor specificity of the enhanced neural response following early odor experience in rats. *Brain Research*, 392, 191–197.
- Coppola, D. M., & O'Connell, R. J. (1989). Stimulus access to olfactory vomeronasal receptors in utero. *Neuroscience Letters*, 106, 241–248.
- Coppola, D. M., & Millar, L. C. (1997). Olfaction *in utero*: Behavioral studies of the mouse fetus. *Behavioural Processes*, 39, 53–68.
- Coppola, D. M., Budde, J., & Millar, L. (1993). The Vomeronasal duct has a protracted postnatal development in the mouse. *Journal of Morphology*, 218, 59–64.
- Coureaud, G., Schaal, B., Coudert, P., Rideaud, P., Fortun-Lamothe, L., Hudson, R., & Orgeur, P. (2000). Immediate postnatal suckling in the rabbit: its influence on pup survival and growth. *Reproduction Nutrition Development*, 40, 19–32.
- Coureaud, G., Schaal, B., Langlois, D., & Perrier, G. (2001). Orientation response of newborn rabbits to odours of lactating females: Relative effectiveness of surface and milk cues. *Animal Behaviour*, 61, 153–162.
- Coureaud, G., Schaal, B., Hudson, R., Orgeur, P., & Coudert, P. (2002). Transnatal olfactory continuity in the rabbit: Behavioral evidence and short-term consequence of its disruption. *Developmental Psychobiology*, 40, 372–390.
- Coureaud, G., Langlois, D., Perrier, G., & Schaal, B. (2003). A single key-odorant accounts for the pheromonal effect of rabbit milk: further test of the mammary pheromone's activity against a wide sample of volatiles from milk. *ChemoEcology*, 13, 187–192.

Coureaud, G., Moncomble, A. S., Montigny, D., Dewas, M., Perrier, G., & Schaal, B. (2006a). A pheromone that rapidly promotes learning in the newborn. *Current Biology*, 16, 1956-1961.

Coureaud, G., Langlois, D., Perrier, G., & Schaal, B. (2006b). Convergent changes in the maternal emission and pup reception of the rabbit mammary pheromone. *ChemoEcology*, 16, 169-174.

Coureaud, G., Rödel, H., Kurz, C. A. & Schaal, B. (2008). Age dependent responsiveness to the mammary pheromone in domestic and wild rabbits. *ChemoEcology*, 18, 52-59.

Coureaud, G., Charra, R., Datiche, F., Sinding, C., Thomas-Danguin, T., Languille, S., Hars B, & Schaal, B. (2010). A pheromone to behave, a pheromone to learn: The rabbit mammary pheromone. *Journal of Comparative Physiology A*, 196, 779-790.

Crawley, J. N. (2000). *What's Wrong With My Mouse? Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. Wiley-Liss: New York.



Darwin, C. (1872). *The Origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. 6th ed. New American Library, New York.

Davis, T. A., Nguyen, H. V., Garcia-Bravo, R., Fiorotto, M. L., Jackson, E. M., & Reeds, P. J. (1994). Amino acid composition of the milk of some mammalian species changes with stage of lactation. *British Journal of Nutrition*, 72, 845-853.

Delaunay-El Allam, M., Marlier, L., & Schaal, B. (2006). Learning at the breast: preference formation for an artificial scent and its attraction against the odor of maternal milk. *Infant Behavior and Development*, 29, 308-321.

Delaunay-El Allam, M., Soussignan, R., Patris, B., Marlier, L., & Schaal, B. (2010). Long lasting memory for an odor acquired at the mother's breast. *Developmental Science*, 13, 849-863.

DePeters, E. J., Hovey, & R. C. (2009). Methods for Collecting Milk from Mice. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 14, 397-400.

Devinoy, E., Stinnakre, M. G., Lavialle, F., Thépot, D., & Ollivier-Bousquet, M. (1995). Intracellular routing and release of caseins and growth hormone produced into milk from transgenic mice. *Experimental Cell Research*, 221, 272-80.

Distel, H., & Hudson, R. (1985). The contribution of olfactory and tactile modalities to the performance of nipple-search behaviour in newborn rabbits. *Journal of Comparative Physiology A*, 157, 599-605.

Do, J., Sullivan, R. M., & Leon, M. (1988). Behavioral and neural correlates of postnatal olfactory conditioning. II. Respiration during conditioning. *Developmental Psychobiology*, 21, 591-600.

Dollinger, M. J., Holloway, W. R., & Denenberg, V. H. (1978). Nipple attachment in rats during the first 24 hours of life. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92, 619-626.

Doucet, S., Soussignan, R., Sagot, P., & Schaal, B. (2007). The “smellscape” of mother's breast: effects of odor masking and selective unmasking on neonatal arousal, oral, and visual responses. *Developmental Psychobiology*, 49, 129-138.

Doucet, S., Soussignan, R., Sagot, P., & Schaal, B. (2009). The Secretion of Areolar (Montgomery's) Glands from Lactating Women Elicits Selective, Unconditional Responses in Neonates. *PLoS ONE*, 4, e7579.

Dragatsis, I., Scott, Z., & Dietrich, P. (2004). Huntingtin-associated protein 1 (Hap1) mutant mice bypassing the early postnatal lethality are neuroanatomically normal and fertile but display growth retardation. *Human Molecular Genetics*, 13, 3115–3125.

Drewett, R. F. (1982). Returning to the suckled breast: a further test of Hall's hypothesis. *Early Human Development*, 6, 161–163.

Drickamer, L. C., Gowaty, P. A., & Holmes, C. M. (2000). Free female mate choice in house mice affects reproductive success and offspring viability and performance. *Animal Behaviour*, 59, 371–378.

Druaux, C., & Voilley, A. (1997). Effect of food composition and microstructure on volatile flavour release. *Trends in Food Science & Technology*, 8, 364–368.

Durand, E., Dauger, S., Vardon, G., Gressens, P., Gaultier, C., De Schonen, S., & Gallego, J. (2003). Classical conditioning of breathing pattern after two acquisition trials in 2-day-old mice. *Journal of Applied Physiology*, 94, 812–818.

E

Ehret, G. (1976). Development of absolute auditory thresholds in the house mouse (*Mus musculus*). *Journal American Audiology Society*, 1, 179–184.

Ehret, G., & Bernecker, C. (1986). Low-frequency sound communication by mouse pups: wriggling calls release maternal behaviour. *Animal Behaviour*, 34, 821–830.

Ellis, L. A. & Picciano M. F. (1992). Milk-borne hormones: regulators of development in neonates. *Nutrition Today*, 27, 6–14.

Elovitz, M. A., & Mrinalini, C. (2004). Animal models of preterm birth. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 15, 479–487.

Ewer, R. F. (1961). Further observations on suckling behaviour in kittens, together with some general considerations of the interrelations of the innate and acquired responses. *Behaviour*, 17, 247–260.

Ewer, R. F. (1968). *Ethology of Mammals*. Logos Press Limited, London (Chapter 10), pp. 234–285.

F

Festing, M. (1968). Some aspects of reproductive performance in inbred mice. *Laboratory Animals*, 2, 89–100.

Fuchs, S. (1981). Consequences of premature weaning on the reproduction of mothers and offspring in laboratory mice. *Zeitschrift für Tierpsychologie-Journal of Comparative Ethology*, 55, 19–32.



Gabe, M. (1956). Contribution à l'histogénèse des glandes salivaires chez la souris. *Cell and Tissue Research*, 45, 74–95.

Galef, B. G., Jr (1981). The ecology of weaning. Parasitism and the achievement of independence by altricial mammals. In P. Klopfer & D. J. Gubernick (Eds.), *Parental care* (pp. 221–241). New York, USA: Plenum Press.

Galef, B. G., Jr, & Henderson, P. W. (1972). Mother's milk: a determinant of the feeding preferences of weaning rat pups. *Journal of Comparative & Physiological Psychology*, 78, 213–219.

Galef, B. G., Jr, & Muskus, P. A. (1979). Olfactory mediation of mother-young contact in Long-Evans rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93, 708e716.

Georgiev, P. (2008). Differences in chemical composition between cow colostrums and milk. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 11, 3–12.

German, J. B., Dillard, C. J., & Ward, R. E. (2002). Bioactive components in milk. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 5, 653–658.

Goldman, A. S. (2000). Modulation of the gastrointestinal tract of infants by human milk. Interfaces and interactions. An evolutionary perspective. *Journal of Nutrition*, 130, 426S–431S.

Gonzalez-Mariscal, G., & Poindron, P. (2002). Parental care in mammals: immediate internal and sensory factors of control. In: D. W. Pfaff, A. M. Etgen, S. E. Fahrbach, R. Moss, R. T. Rubin (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior* (pp. 215–298). New York: Elsevier Science.

Gorewit, R. C., & Sagi, R. (1984). Effects of exogenous oxytocin on production and milking variables of cows. *Journal of Dairy Science*, 67, 2050–2054.

Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., & Romero, R. (2009). Epidemiology and causes of preterm birth, *Lancet*, 371, 75–84.

Görs, S., Kucia, M., Langhammerv, M., Junghans, P., & Metges, C. C. (2009). Milk composition in mice - Methodological aspects and effects of mouse strain and lactation day. *Journal of Dairy Science*, 92, 632–637.

Green, M. R. (1983). Detection in Milk of a 60,000 M_r Mouse and a 68,000 M_r Human Phosphorylated Glycoprotein by Histochemical Analysis on Polyacrylamide Gels. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1, 9–16.

Grueters, A., Alm, J., Lakshmanan, J., & Fisher, D. A. (1985). Epidermal growth factor in mouse milk during early lactation: lack of dependency on submandibular glands. *Pediatric Research*, 19, 853–856.



Haga, S., Hattori, T., Sato, T., Sato, K., Matsuda, S., Kobayakawa, R., Sakano, H., Yoshihara, Y., Kikusui, T., & Touhara, K. (2010). The male mouse pheromone ESP1 enhances female sexual receptive behaviour through a specific vomeronasal receptor. *Nature*, 466, 118.

- Hall, B. (1975) Changing composition of human milk and early development of an appetite control. *Lancet* 1, 779-781.
- Hall, W. G., Cramer, C. P., & Blass, E. M. (1977). Ontogeny of suckling in rats: Transitions toward adult ingestion. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 91, 1141-1155.
- Hameed, A., Anjum, F. M., Zahoor, T., & Jamil, A. (2010). Consequence of oxytocin injections on minerals concentration in Sahiwal cow milk. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 47, 147-152.
- Hamosh, M. (2001). Bioactive factors in human milk. *Pediatric Clinics of North America*, 48, 69-86.
- Hanrahan, J. P. & Eisen, E. J. (1970). A lactation curve for mice. *Laboratory Animal Care*, 20, 101-104.
- Hansen, A. P. (1997). A review of the interactions between milk proteins and dairy flavor compounds. In *Food proteins and lipids* (ed R. Domadaran), pp. 67-76; New York: Plenum.
- Hartmann, P. E. (1973). Changes in the composition and yield of the mammary secretion of cows during the initiation of lactation. *Journal of Endocrinology*, 59, 231-247.
- Harvey, P. J., & Mann, M. A. (1987). Pregnancy-induced autogrooming in mice: the effects of nipple removal. *Developmental Psychobiology*, 20, 593-602.
- Hayes, L. D. (2000). To nest communally or not to nest communally: a review of rodent communal nesting and nursing. *Animal Behaviour*, 59, 677-688.
- Hedrich, H. J., & Bullock, G. (Ed.) (2004). *The laboratory mouse*. New York, CA: Elsevier-Academic Press.
- Heiman, H., & Schanler, R. J. (2006) Benefits of maternal and donor human milk for premature infants. *Early Human Development*, 82, 781-787.
- Hemworth, P. H., Winfield, C. G., & Mullaney, P. D. (1976). A study of the development of teat-order in piglets. *Applied Animal Ethology*, 2, 225-233.
- Hennessy, M. B., Li, J., & Levine, S. (1980). Infant responsiveness to maternal cues in mice of 2 inbred lines. *Developmental Psychobiology*, 13, 77-84.
- Hepper, P.G. (1988). Adaptive fetal learning: prenatal exposure to garlic affects postnatal preferences. *Animal Behaviour*, 36, 935-936.
- Hofer, M. A., Shair, H., & Singh, P. (1976). Evidence that maternal ventral skin substances promote suckling in infant rats. *Physiology and Behavior*, 17, 131-136.
- Hollmann, K. H., & Verley, J. M. (1965). La glande sous-maxillaire de la souris et du rat. *Cell and Tissue Research*, 68, 363-388.
- Holloway, W. R., Dollinger, M. J., & Denenberg, V. H. (1978). Differential nipple attachment by the neonatal rat. *Behavioral and Neural Biology*, 24, 428-441.
- Hongo, T., Hakuba, A., Shiota, K., & Naruse, I. (2000). Suckling dysfunction caused by defects in the olfactory system in genetic arhinencephaly mice. *Biology of the Neonate*, 78, 293-299.
- Hudson, R., & Distel, H. (1982). The pattern of behaviour of rabbit pups in the nest. *Behaviour*, 79, 255-271.
- Hudson, R., & Distel, H. (1983). Nipple location by newborn rabbits: Behavioural evidence for pheromonal guidance. *Behaviour*, 82, 260-275.
- Hudson, R., González-Mariscal, G., & Beyer, C. (1990). Chin marking behavior, sexual receptivity, and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Hormones and Behavior*, 24, 1-13.

Hudson, R., Labra-Cardero, D., & Mendoza-Solovna, A. (2002). Suckling, not milk, is important for the rapid learning of nipple-search odors in newborn rabbits. *Developmental Psychobiology*, 41, 226-235.

Hurst, J. L. (2009). Female recognition and assessment of males through scent. *Behavioural Brain Research*, 200, 295–303.

Hurst, J. L., & Beynon, R. J. (2004). Scent wars: the chemobiology of competitive signalling in mice. *BioEssays*, 26, 1288-1298.

Hurst, J. L., Robertson, D. H. L., Tolladay, U., & Beynon, R. J. (1998). Proteins in urine scent marks of male house mice extend the longevity of olfactory signals. *Animal Behaviour*, 55, 1289–1297.



Jensen, R. G. (ed.) (1995). *Handbook of Milk Composition*. San Diego, CA: Academic Press.

Johanson, I. B., & Hall, W. G. (1979). Appetitive learning in 1-day-old rat pups. *Science*, 205, 419-421.

Johanson, I. B., & Hall, W. G. (1982). Appetitive conditioning in neonatal rats: conditioned orientation to a novel odor. *Developmental Psychobiology*, 15, 379–397.

Johanson, I. B., & Teicher, M. H. (1980). Classical conditioning of an odor preference in 3-day-old rats. *Behavioral and Neural Biology*, 29, 132–136.

Joshi, D., Völkl, M., Shepherd, G. M., & Laska, M. (2006). Olfactory sensitivity for enantiomers and their racemic mixtures--a comparative study in CD-1 mice and spider monkeys. *Chemical Senses*, 31, 655-664.



Keil, W., von Stralendorff, F., & Hudson, R. (1990). A behavioral bioassay for analysis of rabbit nipple-search pheromone. *Physiology and Behavior*, 47, 525–529.

Keller, M., Baum, M. J., & Bakker, J. (2008). Olfactory control of sex-recognition and sexual behavior in mice. In J. L. Hurst, R. J. Beynon, S. C. Roberts, & T. D. Wyatt (Eds.), *Chemical signals in vertebrates*, Vol. 11 (pp. 241–250). Berlin: Springer Verlag.

Keller, M., Baum, M. J., Brock, O., Brennan, P. A., & Bakker, J. (2009). The main and accessory olfactory systems interact in the control of mate recognition and sexual behavior. *Behavioural Brain Research*, 200, 268–276.

Knight, C. H., & Peaker, M. (1982). Effects of fasting during mid pregnancy or early lactation on mammary development and milk yield in mice. *Journal of Dairy Research*, 49, 567-575.

Knight, C. H., Maltz, E., & Docherty, A. H. (1986). Milk yield and composition in mice: Effects of litter size and lactation number. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 84A, 127–133.

Kodama, N. (1990). Preference for amniotic fluid in newborn mice. *Annual Meeting of the International Society for Developmental Psychobiology*, Cambridge, UK.

Koffman, D. J., Petrov, E. S., Varlinskaia, E. I., & Smotherman, W. P. (1998). Thermal, olfactory, and tactile stimuli increase oral grasping of an artificial nipple by the newborn rat. *Developmental psychobiology*, 33, 317-326.

- Koizumi, M., Horiguchi, K., Tomita, Y., Kato, Y., & Harigaya, T. (2003). Prolactin gene expression in the mouse nipple. *The Journal of Reproduction and Development*, 49, 465-472.
- König, B. (1994). Fitness effects of communal rearing in house mice: the role of relatedness versus familiarity. *Animal Behaviour*, 48, 1449-1457.
- König, B., & Markl, H. (1987). Maternal care in house mice. I. The weaning strategy as a means for parental manipulation of offspring quality. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20, 1-9.
- König, B., Riester, J., & Markl, H. (1988). Maternal care in house mice (*Mus musculus*): II. The energy cost of lactation as a function of litter size. *Journal of Zoology*, 216, 195-210.
- Korthank, A. J., & Robinson, S. R. (1998). Effects of amniotic fluid on opioid activity and fetal responses to chemosensory stimuli. *Developmental Psychobiology*, 33, 235-248.
- Krackow, S., & Hoeck, H. N. (1989). Sex ratio manipulation, maternal investment and behavior during concurrent pregnancy and lactation in house mice. *Animal Behaviour*, 37, 177-186.
- Krasnegor, N. A., & Bridges, R. S. (Eds.) (1990). *Mammalian Parenting, Biochemical, Neurobiological, and Behavioral Determinants*. Oxford Univ. Press, New York.
- Kubota, T., Tsuzuki, H., & Saito, M. (1989). Determination of prolactin, growth hormone, β -endorphin, and cortisol in both maternal plasma and amniotic fluid during human gestation. *Acta Endocrinologica*, 121, 297-303.
- Kuroda, K. O., Tachikawa, K., Yoshida, S., Tsuneoka, Y., & Numan, M. (2011). Neuromolecular basis of parental behavior in laboratory mice and rats: with special emphasis on technical issues of using mouse genetics. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35, 1205-1231.



- Labov, J. B., Huck, U. W., Elwood, R. W., & Brooks, R. J. (1985). Current problems in the study of infanticidal behaviour in rodents. *The Quarterly Review of Biology*, 60, 1-20.
- Lagercrantz, H., & Herlenius, E. (2002). Neurotransmitters and neuromodulators. In: Lagercrantz, H., Hanson, M., Evrard, P., & Rodeck, C. H. (eds). *The Newborn Brain: Neuroscience and Clinical Applications*. New York: Cambridge University Press; pp. 139-163.
- Lagerspetz, K. Y. H. (1966). Temperature relations of oxygen consumption and motor activity in newborn mice. *Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiæ Fenniae*, 44, 71-73.
- Langer, P. (2009). Differences in the Composition of Colostrum and Milk in Eutherians Reflect Differences in Immunoglobulin Transfer. *Journal of Mammalogy*, 90, 332-339.
- Larson, M. A., & Stein, B. E. (1984). The use of tactile and olfactory cues in neonatal orientation and localization of the nipple. *Developmental Psychobiology*, 17, 423-436.
- Laska, M., Hudson, R., & Distel, H. (1990). Sensitivity to biologically relevant odours may exceed the sum of component thresholds. *ChemoEcology*, 1, 651-662.
- Leon, M. (1974). Maternal pheromone. *Physiology and Behavior*, 13, 441-453.
- Leon, M., & Moltz, H. (1971). Maternal pheromone: discrimination by preweanling albino rats. *Physiology and Behavior*, 7, 265-267.
- Leon, M., & Moltz, H. (1972). The development of the pheromonal bond in the albino rat.

Physiology and Behavior, 8, 683-686.

Le Roy, I., Roubertoux, P. L., Jamot, L., Maarouf, F., Tordjman, S., Mortaud, S., Blanchard, C., Martin, B., Guillot, P. V., & Duquenne, V. (1998). Neuronal and behavioral differences between *Mus musculus domesticus* (C57BL/6JBy) and *Mus musculus castaneus* (CAST/Ei). Behavioural Brain Research, 95, 135–142.

Lin, W., Arellano, J., Slotnick, B., & Restrepo, D. (2004). Odors detected by mice deficient in cyclic nucleotide-gated channel subunit A2 stimulate the main olfactory system. The Journal of Neuroscience, 24, 3703–3710.

Lincoln, D. W., Hentzen, K., Hin, T., Van Der Schoot, P., Clarke, G., & Summerlee, A. J. S. (1980). Sleep: a prerequisite for reflex milk ejection in the rat. Experimental Brain Research, 38, 151-162.

Lisk, R. D. (1971). Oestrogen and progesterone synergism and elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*). Animal Behaviour, 19, 606–610.

Logan, D. W., Brunet, L. J., Webb, W. R., Cutforth, T., Ngai, J., & Stowers, L. (2012). Learned Recognition of Maternal Signature Odors Mediates the First Suckling Episode in Mice. Current Biology, doi: 10.1016/j.cub.2012.08.041.



Macfarlane, A. (1975). Olfaction in the development of social preferences in the human neonate. Ciba Foundation symposium, 33, 103-113.

Mainardi, D., Marsan, M., & Pasquali, A. (1965). Causation of sexual preferences of the house mouse. The behaviour of mice reared by parents whose odour was artificially altered. Atti della Societa Italiana di scienze nazionali e del museo civico di storia naturale di Milano, 104, 325-338.

Manning, C. J., Dewsbury, D. A., Wakeland, E. K., & Potts, W. K. (1995). Communal nesting and communal nursing in house mice, *Mus musculus domesticus*. Animal Behaviour, 50, 741–751.

Marchlewska-Koj, A., Pochron, E., & Sliwowska, A. (1990). Salivary glands and preputial glands of males as source of estrus-stimulating pheromone in female mice. Journal of Chemical Ecology, 16, 2817-2822.

Marlier, L., & Schaal, B. (2005). Human newborns prefer human milk: conspecific milk odor is attractive without postnatal exposure. Child Development, 76, 155-168.

Marlier, L., Schaal, B., & Soussignan, R. (1997). Orientation responses to biological odors in the human newborn: initial pattern and postnatal plasticity. Les Comptes Rendus de l'Académie des sciences III, 320, 999–1005.

Marlier, L., Schaal, B., & Soussignan, R. (1998). Neonatal Responsiveness to the Odor of Amniotic and Lactal Fluids: A Test of Perinatal. Chemosensory Continuity. 69, 611–623.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M. L., Olivares, M., Boza, J., Jiménez, J., Fernández, L., Xaus, J., & Rodríguez, J. M. (2004). The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in Food Science & Technology, 15, 121-127.

Martinez-Garcia, F., Martinez-Ricos, J., Augustin-Pavon, C., Martinez-Hernandez, J., Novejarque, A., & Lanuza, E. (2009). Refining the dual olfactory hypothesis: Pheromone reward and odour experience. Behavioural Brain Research, 200, 277–286.

McLean, J. H., Darby-King, A., Sullivan, R. M., & King, S. R. (1993). Serotonin and olfactory learning in the neonatal rat. Behavioral and Neural Biology, 60, 152–162.

- McLean, J. H., Darby-King, A., & Harley, C. W. (2005). Potentiation and prolongation of long-term odor memory in neonate rats using a phosphodiesterase inhibitor. *Neuroscience*, 135, 329–334.
- Mellier, D., Marret, S., Soussignan, R. & Schaal, B. (2008). Le nouveau né prématuré: un modèle pour l'étude du développement du comportement alimentaire. *Enfance*, 3, 241-249.
- Mendl, M., & Paul, E. S. (1991). Litter Composition Affects Parental Care, Offspring Growth and the Development of Aggressive Behaviour in Wild House Mice. *Behaviour*, 116, 90-108.
- Mendez-Gallardo, V., & Robinson, S. R. (2011). Amniotic fluid and milk odor evoke crawling locomotion in the newborn rat. Presented at 44th Annual Meeting of the International Society for Developmental Psychobiology, Washington, USA.
- Mennella, J. A., & Beauchamp, G. K. (1991). Maternal diet alters the sensory qualities of human milk and the nursling's behavior. *Pediatrics*, 88, 737–744.
- Merton, H. (1938). Studies on reproduction in the albino mouse. I. The period of gestation and the time of parturition. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 58, 80-96.
- Miettinen, S. M., Hyvonen, L., Linforth, R. S. T., Taylor, A. J., & Tuorila, H. (2004). Temporal aroma delivery from milk systems containing 0–5% added fat, observed by free choice profiling, time intensity, and atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8111– 8118.
- Miller, S. S., & Spear, N. E. (2008). Olfactory learning in the rat neonate soon after birth. *Developmental Psychobiology*, 50, 554–565.
- Miller, S. S., & Spear, N. E. (2009). Olfactory learning in the rat immediately after birth: Unique salience of first odors. *Developmental Psychobiology*, 51, 488–504.
- Miller, S. S., & Spear, N. E. (2010). Mere Odor Exposure Learning in the Rat Neonate Immediately After Birth and 1 Day Later. *Developmental Psychobiology*, 52, 343-351.
- Mizuno, K., & Ueda, A. (2004). Antenatal olfactory learning influences infant feeding. *Early Human Development*, 76, 83–90.
- Moio, L., Rillo, L., Ledda, A., & Addeo, F. (1996). Odorous constituents of ovine milk in relationship to diet. *Journal of Dairy Science*, 79, 1322–1331.
- Moltz, H., & Lee, T. M. (1983). The coordinate roles of mother and young in establishing and maintaining pheromonal symbiosis in the rat. In: Rosenblum LA, Moltz H, editors. *Symbiosis in parent-offspring interactions*. New York: Plenum Press. pp. 45-60.
- Moncho-Bogani, J., Lanuza, E., Hernandez, A., Novejarque, A., & Martinez-Gomez, F. (2002). Attractive properties of sexual pheromones in mice: Innate or learned ? *Physiology and Behavior*, 77, 167–176.
- Moncomble, A. S., Coureaud, G., Quenenedey, B., Langlois, D., Perrier, G., Brossut, R., & Schaal, B. (2005). The mammary pheromone of the rabbit: Where does it come from? *Animal Behaviour*, 69, 29–38.
- Morrow-Tesch, J., & McGlone, J. J. (1990). Sources of maternal odors and the development of odor preferences in baby pigs. *Journal of Animal Science*, 68, 3563–3571.
- Müller-Schwarze, D. (2006). *Chemical ecology of vertebrates*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Müller-Schwarze, D. M., & Houlihan, D. (1991). Pheromonal activity of single castoreum constituents in Beaver, *Castor Canadensis*. *Journal of Chemical Ecology*, 17, 715–734.
- Murray, S. A., Morgan, J. L., Kane, C., Sharma, Y., Heffner, C. S., Lake, J., & Donahue, L. R. (2010). Mouse gestation length is genetically determined. *PLoS One*, 5, e12418.



Nejsum, L. N., Praetorius, J., & Nielsen, S. (2005). NKCC1 and NHE1 are abundantly expressed in the basolateral plasma membrane of secretory coil cells in rat, mouse, and human sweat glands. *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, 289, C333–C340.

Neville, M. C. (1995). Lactogenesis in women: A cascade of events revealed by milk composition. In *The Composition of Milks* (ed. R. D. Jensen), pp. 87-98. San Diego, CA: Academic Press.

Neville, M. C., Morton, J., & Umemura, S. (2001). Lactogenesis: the transition from pregnancy to lactation. *Pediatric Clinics of North America*, 48, 35–52.

Newburg, D. S. (2001). Bioactive components of human milk: evolution, efficiency, and protection. *Advances in experimental medicine and biology*, 501, 3–10.

Nien, C. J., Paugh, J. R., Massei, S., Wahlert, A. J., Kao, W. W., & Jester, J. V. (2009). Age-related changes in the meibomian gland. *Experimental Eye Research*, 89, 1021–1027.

Nixon, A., Mallett, A. I., & Gower, D. B. (1988). Simultaneous quantification of five odorous steroids (16-androstenes) in the axillary hair of men. *Journal of Steroid Biochemistry*, 29, 505-551.

Noirot, E. (1972). Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Developmental Psychobiology*, 5, 371–387.

Nolte, D. L., & Mason, J. R. (1995). Maternal ingestion of ortho-aminoacetophenone during gestation affects intake by offspring. *Physiology and Behavior*, 58, 925–928.

Nowak, R., Goursaud, A. P., Lévy, F., Orgeur, P., Schaal, B., Belzung, C., Picard, M., Meunier-Salaün, M. C., Alster, P., & Uvnäs-Moberg, K. (1997). Cholecystokinin receptors mediate the development of a preference for the mother by newly born lambs. *Behavioral Neuroscience*, 111, 1375-1382.

Nusser, K. D., & Frawley, L. S. (2001). Is milk a conduit 451 for developmental signals? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 501, 71-77.

Nysenbaum, A. N. & Smart, J. L. (1982). Suckling behavior and milk intake of neonates in relation to milk fat content. *Early Human Development*, 6, 205-213.



Oftedal, O. T. (2002). The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *J. Mamm. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7, 225–251.

Oftedal, O. T., & Iverson, S. J. (1995). Comparative analysis of nonhuman milks: A phylogenetic variation in gross composition of milks. In: Jensen, R. G., editor. *Handbook of milk composition*. San Diego, CA: Academic Press. pp. 749-788.

Ontsouka, C. E., Bruckmaier, R. M., & Blum, J. W. (2003). Fractionized milk composition during removal of colostrum and mature milk. *Journal of Dairy Science*, 86, 2005-2011.

Oostindjer, M., Al Aïn, S., Patris, B., Cadiou, H., Grosmaître, X., & Schaal, B. (2011). Psychobiological effects of perinatal exposure to odorants in mice. Part II: Behavioural alterations *Chemical Senses*, 36, E76–E77.



- Packer, C., Lewis, S., & Pusey, A. (1992). A comparative analysis of non-offspring nursing. *Animal Behaviour*, 43, 265–281.
- Parfet, K. A. R., & Gonyou, H. W. (1991). Attraction of newborn piglets to auditory, visual, olfactory, and tactile stimuli. *Journal of Animal Science*, 69, 125–133.
- Patris, B., Perrier, G., Schaal, B., & Coureaud, G. (2008). Early development of filial preferences in the rabbit: implications of nursing- and pheromone-induced odour learning? *Animal Behaviour*, 76, 305–314.
- Patris, B., Lesimple, C., & Schaal, B. (2009). Perinatal odour learning in mice: Impact on odour preference and intake. Presented at the 31st International Ethological Conference, Rennes, France.
- Patton, S., Canfield, L. M., Huston, G. E., Ferris, A. M., & Jensen, R. G. (1990). Carotenoids in human colostrum. *Lipids*, 25, 159–165.
- Peaker, M. (1998). Milk: Integrative signaling between mother and offspring. *Biochemical Society Transactions*, 26, 103–106.
- Pedersen, P. E., & Blass, E. M. (1981). Olfactory control over suckling in albino rats. In: R. N. Aslin, J. R. Alberts, M. R. Pedersen (Eds.), *The development of perception: Psychobiological perspectives* (pp. 359–381). New York: Academic Press.
- Pedersen, P. A., & Blass, E. M. (1982). Prenatal and postnatal determinants of the 1st suckling episode in albino rats. *Developmental Psychobiology*, 15, 349–355.
- Pedersen, P. E., Williams, C. L., & Blass, E. M. (1982). Activation and odor conditioning of suckling behavior in 3-day-old albino rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 8, 329–341.
- Petrov, E. S., Varlinskaya, E. I., & Smotherman, W. P. (1997). The newborn rat ingests fluids through a surrogate nipple: A new technique for the study of early suckling behavior. *Physiology and Behavior*, 62(5), 1155–1158.
- Petrov, E. S., Varlinskaya, E. I., Bregman, K., & Smotherman, W. P. (1999). Sustained attachment to the nipple in the newborn rat depends on experience with the nipple, milk, and expression of oral grasping. *Behavioral Neuroscience*, 113, 211–221.
- Porter, R. H., & Doane, H. M. (1976). Maternal pheromone in the spiny mouse (*Acomys cahirinus*). *Physiology and Behavior*, 16, 75–78.
- Porter, R. H., Doane, H. M., & Cavallaro, S. A. (1978). Temporal parameters of responsiveness to maternal pheromone in *Acomys cahirinus*. *Physiology & Behavior*, 21, 563–566.
- Price, T. L., Darby-King, A., Harley, C. W., McLean, & J. H. (1998). Serotonin plays a permissive role in conditioned olfactory learning induced by norepinephrine in the neonate rat. *Behavioral neuroscience*, 112, 1430–1437.
- Putter, J., & Sagner, C. (1973). Chemical studies to detect residues of xylazine hydrochloride. *Veterinary Medical Review*, 2, 145–159.



- Ragueneau, S. (1987). Early development in mice: VI. Quantity and gross composition of milk in five inbred strains. *Physiology and Behavior*, 40, 431–435.
- Raihani, G., Gonzalez, D., Arteaga, L., & Hudson, R. (2009). Olfactory guidance of nipple attachment and suckling in kittens of the domestic cat: Inborn and learned responses. *Developmental Psychobiology*, 51, 662–671.
- Raimbault, C., Saliba, E., & Porter, R. H. (2007). The effect of the odor of mother's milk on breastfeeding behavior of premature infants. *Acta Paediatrica*, 96, 368–371.
- Ratajczak, C. K., & Muglia, L. J. (2008). Insights into parturition biology from genetically altered mice. *Pediatric Research*, 64, 581–589.
- Renfree, M. B., Hensleigh, H. C., & McLaren, A. (1975). Developmental changes in the composition and amount of mouse fetal fluids. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 33, 435–446.
- Richards, R. C., & Beardmore, J. M. (1984). Prolactin concentrations in mouse milk during lactation. *Experientia*, 40, 757–758.
- Richert, M. M., Schwertfeger, K. L., Ryder, J. W., & Anderson, S. M. (2000). An Atlas of Mouse Mammary Gland Development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5, 227–241.
- Rijnkels, M., Wheeler, D. A., de Boer, H. A., & Pieper, F. R. (1997). Structure and expression of the mouse casein gene locus. *Mammalian Genome*, 8, 9–15.
- Riley, L. G., Zubair, M., Thomson, P. C., Holt, M., Xavier, S. P., Wynn, P. C., & Sheehy, P. A. (2006). Lactational performance of Quackenbush Swiss line 5 mice. *Journal of Animal Science*, 84, 2118–2125.
- Rimbault, M., Robin, S., Vaysse, A., & Galibert, F. (2009). RNA profiles of rat olfactory epithelia: individual and age related variations. *BMC Genomics*, 10, 572.
- Roberts, S. A., Simpson, D. M., Armstrong, S. D., Davidson, A. J., Robertson, D. H., McLean, L., Beynon, R. J., & Hurst, J. L. (2010). Darcin: A male pheromone that stimulates female memory and sexual attraction to an individual male's odour. *BMC Biology*, 8, 75.
- Robinson, S. R., & Mendez-Gallardo, V. (2010). Amniotic fluid as an extended milieu intérieur. In K. E. Hood, C. T. Halper, G. Greenberg, & R. M. Lerner (Eds.), *Handbook of developmental science, behavior, and genetics* (pp. 234–284). New York: Blackwell.
- Ronca, A. E., & Alberts, J. R. (1994). Sensory factors associated with gestation and parturition evoke cardiac and behavioral responses in fetal rats. *Psychobiology*, 55, 270–282.
- Ronca, A. E., & Alberts, J. R. (1995). Maternal contributions to fetal experience and the transition from prenatal to postnatal life. In J. P. Lecanuet, W. Fifer, N. A., Krasnegor, & W. P. Smotherman (Eds.), *Fetal development and behavior* (pp. 331–350). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Ronca, A. E., Lamkin, C. A., & Alberts, J. R. (1993). Maternal contributions to sensory stimulation in fetal and newborn rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 107, 61–74.
- Ronca, A. E., Abel, R. A., Ronan, P. J., Renner, K. J., & Alberts, J. R. (2006). Effects of labor contractions on catecholamine release and breathing frequency in newborn rats. *Behavioral Neuroscience*, 120, 1308–1314.

- Rosenblatt, J. S. (1983). Olfaction mediates developmental transitions in the altricial newborn of selected species of mammals. *Developmental Psychobiology*, 16, 347-375.
- Rosenblatt, J. S., & Lehrman, D. S. (1963). Maternal behavior of the laboratory rat. In: Rheingold, H. L., editor. *Maternal Behavior in Mammals*. John Wiley & Sons; New York: p. 8-57.
- Rosenblatt, J. S., & Snowdon, C. T. (Eds.) (1996). *Parental care. Evolution, mechanisms, and adaptive significance*. Academic Press, San Diego, CA.
- Roth, L. L., & Rosenblatt, J. S. (1967). Changes in self-licking during pregnancy in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 63, 397-400.
- Roubertoux, P., Semal, C., & Ragueneau, S. (1985). Early development in mice: II. Sensory motor behavior and genetic analysis. *Physiology and Behavior*, 35, 659-666.
- Rubino, A., Zimbalatti, F., & Auricchio, S. (1964). Intestinal disaccharidase activities in adult and suckling rats. *Biochimica et biophysica acta*, 92, 305-311.



- Salimei, E., Varisco, G., & Rosi, F. (2002). Major constituents, leptin, and non-protein nitrogen compounds in mares' colostrum and milk. *Reproduction Nutrition Development*, 42, 65-72.
- Sayler, A., & Salmon, M. (1969). Communal nursing in mice: influence of multiple mothers on the growth of the young. *Science*, 164, 1309-1310.
- Sayler, A., & Salmon, M. (1971). An ethological analysis of communal nursing by the house mouse (*Mus musculus*). *Behaviour*, 40, 62-85.
- Scattoni M. L., Crawley, J., & Ricceri, L. (2009). Ultrasonic vocalizations: a tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 33, 508-515.
- Schaal, B. (2005). From amnion to colostrum to milk: bridging in early developmental transitions. In: B. Hopkins, S. Johnson (Eds.), *Prenatal development of postnatal functions* (pp. 52-102). Westport, CT: Praeger.
- Schaal, B. (2010). Mammary Odor Cues and Pheromones: Mammalian Infant-Directed Communication about Maternal State, Mammary, and Milk. *Vitamins & Hormones*, 83, 83-136.
- Schaal, B., & Orgeur, P. (1992). Olfaction in utero: Can the rodent model be generalized? *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 44B, 245-278.
- Schaal, B., Marlier, L., & Soussignan, R. (1995a). Responsiveness to the odor of amniotic fluid in the human neonate. *Biology of the Neonate*, 67, 397-406.
- Schaal, B., Orgeur, P., & Arnould, C. (1995b). Olfactory preferences in newborn lambs: Possible influence of prenatal experience. *Behaviour*, 132, 351-365.
- Schaal, B., Marlier, L., & Soussignan, R. (1998). Olfactory function in the human foetus: Evidence from selective neonatal responsiveness to the odor of amniotic fluid. *Behavioral Neuroscience*, 112, 1438-1449.
- Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Ginies, C., Sémon, E., & Perrier, G. (2003). The mammary pheromone of the rabbit: chemical and behavioural characterisation. *Nature*, 424, 68-72.

- Schaal, B., Doucet, S., Sagot, P., Hertling, E., & Soussignan, R. (2006). Human breast areolae as scent organs: Morphological data and possible involvement in maternal-neonatal coadaptation. *Developmental Psychobiology*, 48, 100–110.
- Schaal, B., Coureaud, G., Moncomble, A. S., Langlois, D., & Perrier, G. (2008a). Many common odour cues and (at least) one pheromone shaping the behaviour of young rabbits. In P. C. Alves, N. Ferr, & K. Hackländer (Eds.), *Lagomorph biology: Evolution, ecology and conservation* (pp. 189–209). Berlin: Springer Verlag.
- Schaal, B., Doucet, S., Soussignan, R., Rietdorf, M., Weibchen, G., & Francke, W. (2008b). The human breast as a scent organ: Exocrine structures, secretions, volatile components, and possible functions in breastfeeding interactions. In J. L. Hurst, R. J. Beynon, S. C. Roberts, & T. D. Wyatt (Eds.), *Chemical signals in vertebrates*, Vol. 11. (pp. 325–335). Berlin: Springer Verlag.
- Schaal, B., Coureaud, G., Doucet, S., Delaunay-El Allam, M., Moncomble, A. S., Montigny, D., Patris, B., & Holley, A. (2009). Mammary olfactory signalisation in females and odor processing in neonates: ways evolved by rabbits and humans. *Behavioural Brain Research*, 200, 346–358.
- Schaller, F., Watrin, F., Stumy, R., Massacrier, A., Szepletowski, P., & Muscatelli, F. (2010). A single postnatal injection of oxytocin rescues the lethal feeding behaviour in mouse newborns deficient for the imprinted *Magel2* gene. *Human Molecular Genetics*, 19, 4895–4905.
- Schanler, R. J. (2011). Outcomes of Human Milk-Fed Premature Infants. *Seminars in Perinatology*, 35, 29–33.
- Schellinck, H. M., Forestell, C. A. & LoLordo, V. M. (2001). A simple and reliable test of olfactory learning and memory in mice. *Chemical senses*, 26, 663–672.
- Sellers, G., Lin, H. C., Riddell, M. G., Ravis, W. R., Lin, Y. J., Duran, S. H., & Givens, M. D. (2010). Pharmacokinetics of ketamine in plasma and milk of mature Holstein cows. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 33, 480–484.
- Serafim, A. P., & Felicio, L. F. (2002). Reproductive experience influences grooming behavior during pregnancy in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35, 391–394.
- Shahan, K., Denaro, M., Gilmartin, M., Shi, Y., & Derman, E. (1987). Expression of six mouse major urinary protein genes in the mammary, parotid, sublingual, submaxillary, and lachrymal glands and in the liver. *Molecular and Cellular Biology*, 7, 1947–1954.
- Shimoda, Y. T., Ishikawa, H., Hayakawa, I., & Osajima, Y. (2000). Volatile compounds of human milk. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 45, 199–206.
- Silverman, J., Stone, D. W., & Powers, J. D. (1992). The lipid composition of milk from mice fed high or low fat diets. *Laboratory Animals*, 26, 127–131.
- Singh, P. J., & Hofer, M. A. (1978). Oxytocin reinstates maternal olfactory cues for nipple orientation and attachment in rat pups. *Physiology and Behavior*, 20, 385–389.
- Singh, P. J., Tucker, A. M., & Hofer, M. A. (1976). Effects of nasal ZnSO₄ irrigation and olfactory bulbectomy on rat pups. *Physiology & Behavior*, 17, 373–382.
- Small, W. S. (1899). Notes on the psychic development of the young white rat. *American Journal of Psychology*, 11, 80–100.
- Smith, J. S. (1981). Mouse model for abortive rabies infection in the central nervous system. *Infection and Immunity*, 16, 297–308.
- Smotherman W. P. (1982). In utero chemosensory experience alters taste preferences and corticosterone responsiveness. *Behavioral and Neural Biology*, 36, 61–68.

- Smotherman, W. P., & Robinson, S. R. (1992). Dimethyl disulfide mimics the effects of milk on fetal behavior and responsiveness to cutaneous stimuli. *Physiology and Behavior*, 52, 761-765.
- Smotherman, W. P., Richards, L. S., & Robinson, S. R. (1984). Techniques for observing fetal behavior in utero: A comparison of chemomyelotomy and spinal transection. *Developmental Psychobiology*, 17, 661-674.
- Smotherman, W. P., Goffman, D., Petrov, E. S., & Varlinskaya E. I. (1997). Oral grasping of a surrogate nipple by the newborn rat. *Developmental Psychobiology*, 31, 3-17.
- Shoji, H., & Kato, K. (2006). Maternal behavior of primiparous females in inbred strains of mice: a detailed descriptive analysis. *Physiology and Behavior*, 89, 320-328.
- Shoji, H., Kato, K. (2009). Maternal care affects the development of maternal behavior in inbred mice. *Developmental Psychobiology*, 51, 345-357.
- Spielman, A. I., Zeng, X. N., Leyden, J. J., & Preti, G. (1995). Proteinaceous precursors of human axillary odor: isolation of two novel odor-binding proteins. *Experientia*, 51, 40-47.
- Stawe, U. (Ed.) (1978). *Perinatal physiology*. Plenum, New York.
- Stevens, L. M., & Landis, S. C. (1987). Development and properties of the secretory response in rat sweat glands: Relationship to the induction of cholinergic function in sweat gland innervation. *Developmental Biology*, 123, 179-190.
- Sullivan, R. M., & Hall, W. G. (1988). Reinforcers in infancy: classical conditioning using stroking or intra-oral infusions of milk as UCS. *Developmental Psychobiology*, 21, 215-223.
- Sullivan, R. M., & Leon, M. (1987). One-trial olfactory learning enhances olfactory bulb responses to an appetitive conditioned odor in 7-dayold rats. *Brain Research*, 432, 307-311.
- Sullivan, R. M., & Wilson, D. A. (1990). Plasticity in the reinforcement system of infant rats. *Society for Neuroscience Abstracts*, 16, 917.
- Sullivan, R. M., Brake, S. C., Hofer, M. A., & Williams, C. L. (1986a). Huddling and independent feeding of neonatal rats can be facilitated by a conditioned change in behavioral state. *Developmental Psychobiology*, 19, 625-635.
- Sullivan, R. M., Hofer, M. A., & Brake, S. C. (1986b). Olfactory-guided orientation in neonatal rats is enhanced by a conditioned change in behavioral state. *Developmental Psychobiology*, 19, 615-623.
- Sullivan, R. M., Wilson, D. A., & Leon, M. (1989). Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *The Journal of Neuroscience*, 9, 3998-4006.
- Sullivan, R. M., McGaugh, J. L., & Leon, M. (1991a). Norepinephrine-induced plasticity and one-trial olfactory learning in neonatal rats. *Developmental Brain Research*, 60, 219-228.
- Sullivan, R. M., Taborsky-Barba, S., Mendoza, R., Itano, A., Leon, M., Cotman, C. W., Payne, T. F., & Lott, I. (1991b). Olfactory classical conditioning in neonates. *Pediatrics*, 87, 511-518.
- Sun, C. Q., O'Connor, C. J., & Robertson, A. M. (2002). The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chemico-Biological Interactions*, 140, 185-198.



Tazir, B, Cadiou, H., & Grosmaître, X. (2011). Psychobiological effects of perinatal exposure to odorants in mice. Part I: Morphological changes in the olfactory epithelium Abstracts from the XXth Congress of

European Chemoreception Research Organization, ECRO-2010, Avignon, France. *Chemical Senses*, 36, E76.

Teicher, M. H., & Blass, E. M. (1976). Suckling in newborn rats: eliminated by nipple lavage, reinstated by pup saliva. *Science*, 193, 422-425.

Teicher, M. H., & Blass, E. M. (1977). First suckling response of the newborn albino rat: the roles of olfaction and amniotic fluid. *Science*, 198, 635-636.

Terry, L. M., & Johanson, I. B. (1996). Effects of altered olfactory experiences on the development of infant rats' responses to odors. *Developmental Psychobiology*, 29, 353-77.

Thomas, N. R., Fonken, L. K., LeBlanc, M., & Cornwell, C. A. (2010). Maternal separation alters social odor preference development in infant mice (*Mus musculus*). *Journal of Comparative Psychology* 124, 295-301.

Tinbergen, N. (1963). On aims and methods of ethology. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 20, 410-433.

Todrank, J., Busquet, N., Baudoin, C., & Heth, G. (2005). Preferences of newborn mice for odours indicating closer genetic relatedness: Is experience necessary? *Proceeding of the Royal Society B*, 272, 2083–2088.

Todrank, J., Heth, G., & Restrepo, D. (2011). Effects of *in utero* odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odor preferences. *Proceeding of the Royal Society B*, 278, 1949–1955.

Tovar, A. R., Becerril, E., Hernández-Pando, R., López, G., Suryawan, A., Desantiago, S., Hutson, S. M., & Torres, N. (2001). Localization and expression of BCAT during pregnancy and lactation in the rat mammary gland. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 280, 480-488.

Toyoshima, Y., Ohsako, S., Nagano, R., Matsumoto, M., Hidaka, S., & Nishinakagawa, H. (1998). Histological changes in mouse nipple tissue during the reproductive cycle. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60, 405-411.

Turetsky, B. I., & Moberg, P. J. (2009). An odor-specific threshold deficit implicates abnormal intracellular cyclic AMP signaling in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 166, 226-233.



Val-Laillet, D., Giraud, S., Tallet, C., Boivin, X., & Nowak, R. (2006). Non nutritive sucking: One of the major determinants of filial love. *Developmental Psychobiology*, 48, 220-232.

Valsecchi, P., & Galef, B. G., Jr. (1989). Social influences on the food preferences of house mice (*Mus musculus*). *International Journal of Comparative Psychology*, 2, 245-256.

Valsecchi, P., Mainardi, M., Sgolfo, A., & Taticchi, A. (1989). Maternal influences on food preferences in weanling mice (*Mus domesticus*). *Behavioural Processes*, 19, 155-166.

Vandenbergh, J. G. (1969). Male odor accelerates female sexual maturation in mice. *Endocrinology*, 84, 658–660.

van Meer, P., & Raber, J. (2005). Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochemical Journal*, 389, 593-610.

Varendi, H., Porter, R. H., & Winberg, J. (2002). The effect of labor on olfactory exposure learning within the first postnatal hour. *Behavioral Neuroscience*, 116, 206–211.

Veloso, C., Place, N. J., & Kenagy, G. J. (2003). Milk composition of free-living yellow-pine chipmunks (*Tamias amoenus*): temporal variation during lactation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 134, 387-392.

Venge, O. (1963). The influence of nursing behaviour and milk production on early growth in rabbits. *Animal Behaviour*, 11, 500-506.

Vilches, J. J., Ceballos, D., Verdu, E., & Navarro, X. (2002). Changes in mouse sudomotor function and sweat gland innervation with ageing. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 95, 80-87.

Vince, M. A., & Billing, A. E. (1986). Infancy in the sheep: The parts played by sensory stimulation in bonding between the ewe and lamb. In "Advances in Infancy Research," (L. P. Lipsitt and C. Rovee-Collier, Eds.), Vol. 4, pp. 2-37. Ablex, Norwood, NJ.

Vince, M. A., & Ward, T. M. (1984). The responsiveness of newly born Clunforest lambs to odor sources in the ewe. *Behaviour*, 87, 117-127.

Vince, M. A., Lynch, J. J., Mottershead, B. E., Green, G. C., & Elwin, R. L. (1987). Interaction between normal ewes and newly born lambs deprived of visual, olfactory and tactile sensory information. *Applied Animal Behaviour Science*, 19, 119-136.

Voloschin, L. M., & Tramezzani, J. G. (1979). Milk ejection reflex linked to slow wave sleep in nursing rats. *Endocrinology*, 105, 1202-1207.



Weber, E. M., & Olsson, I. A. S. (2008). Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: An ethological review. *Applied Animal Behaviour Science*, 114, 1-22.

Whitten, W. K. (1956). Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male. *Journal of Endocrinology*, 13, 399-404.

Whitten, W. K. (1957). Effect of exteroceptive factors on the oestrous cycle of mice. *Nature*, 180, 1436.

Whitten, W. K. (1958). Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male; changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears. *Journal of Endocrinology*, 17, 307-313.

Wilkinson, G. S., & Baker, A. E. M. (1988). Communal nesting among genetically similar house mice. *Ethology*, 77, 103-114.

Williams, E., & Scott, J. P. (1953). The development of social behavior patterns in the mouse, in relation to natural periods. *Behavior*, 6, 35-67.

Wilson E. D., & Edwards, R. G. (1963). Parturition and increased litter size in mice after superovulation. *Journal of Reproduction and Fertility*, 5, 179-186.

Wilson, D. A., & Sullivan, R. M. (1994). Neurobiology of Associative Learning in the Neonate: Early Olfactory Learning. *Behavioral and Neural Biology*, 61, 1-18.

Wong, S. T., Trinh, K., Hacker, B., Chan, G. C., Lowe, G., Gaggar, A., Xia, Z., Gold, G. H., & Storm, D. R. (2000) Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice. *Neuron*, 27, 487-497.

Wyatt, T. D. (2003). Pheromones and animal behaviour: Communication by smell and taste. Cambridge University Press, Cambridge, UK.



Yoneda, M., Shiraishi, J., Kuraishi, T., Aoki, F., Imakawa, K., & Sakai, S. (2001). Gastric Proteinase Digestion of Caseins in Newborn Pups of the Mouse. *Journal of Dairy Science*, 84, 1851–1855.

Youngentob, S. L., & Glendinning, J. I. (2009). Fetal ethanol exposure increases ethanol intake by making it smell and taste better. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 106, 5359–5364.

Youngentob, S. L., Schwob, J. E., Sheehe, P. R., & Youngentob, L. M. (1997). Odorant threshold following methyl bromide-induced lesions of the olfactory epithelium. *Physiology & behaviour*, 62, 1241-1252.



Zarrow, M. X., Denenberg, V. H., & Anderson, C. O. (1965). Rabbit: frequency of suckling in the pup. *Science*, 150, 1835–1836.

VI) ANNEXES

ANNEXES 1

EXPLORATION PRÉFÉRENTIELLE DES SOURICEAUX P6 DANS UNE ARENE A DOUBLE-CHOIX OLFACTIF (compléments section II.1)

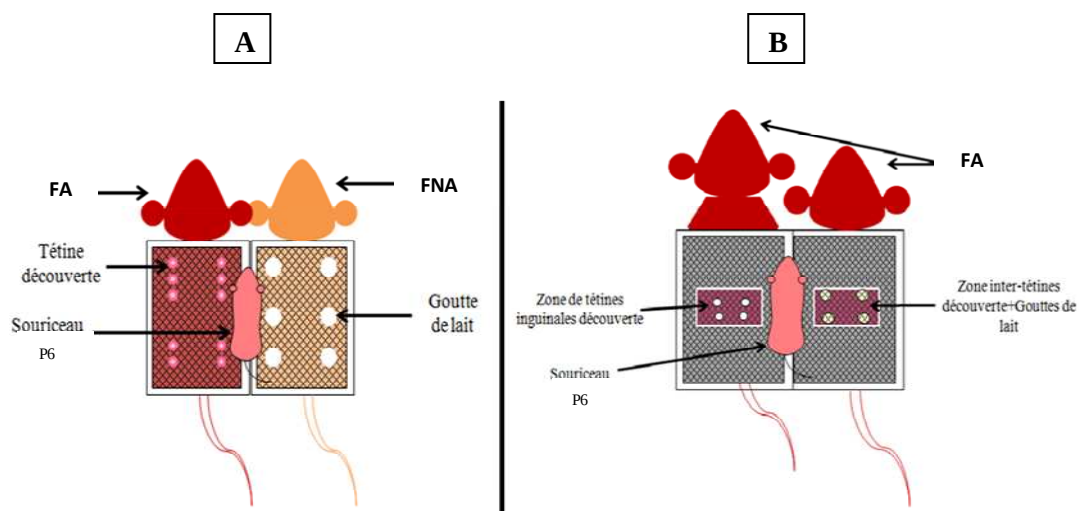
1) Rôle de l'odeur du lait dans la localisation de la tétine

But & Méthodologie

Dans une étude ultérieure (voir Al Aïn et al., 2011), nous avons mis en évidence que les souriceaux P6 préfèrent explorer : 1) les odeurs abdominales de femelles gestantes allaitantes (FA) par rapport à celles de femelles gestantes non allaitantes (FNA), et 2) les odeurs émanant d'une zone mammaire d'une FA par rapport à une zone abdominale dépourvue de tétine.

Face à ces réponses comportementales différenciées, nous avons supposé que les résidus de lait présents sur l'abdomen de FA, et plus particulièrement sur ses télines, pourraient expliquer cette préférence des souriceaux envers les FA. Ainsi, six gouttes de lait (14 μ L/goutte, soit 84 μ L au total) ont été déposées sur l'abdomen de FNA (condition A) et quatre gouttes (14 μ L/goutte, soit 56 μ L au total) ont été déposées sur une zone abdominale dépourvue de tétine d'une FA (condition B ; voir **Figure 1**).

L'âge lactationnel des femelles allaitantes utilisées (i.e., animaux-stimuli ou femelles donneuses de lait) était situé entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour de lactation. Ce choix a été motivé par le fait que le lait est produit en plus grande quantité à cette période de lactation (Hanrahan, 1970). Les femelles étaient isolées 4 heures avant le test. Le lait utilisé était frais.



Résultats

Nous avons mis en évidence que la préférence en faveur des FA est abolie par l'ajout de quelques gouttes du lait frais sur l'abdomen des FNA (**Figure 2** ; $N=21$, $t=0.176$, $p=0.862$). De même, la préférence pour la zone mammaire d'une FA est abolie par l'ajout de gouttes de lait déposées sur une zone abdominale dépourvue de tétine d'une FA ($N=20$, $t=1.027$, $p=0.317$).

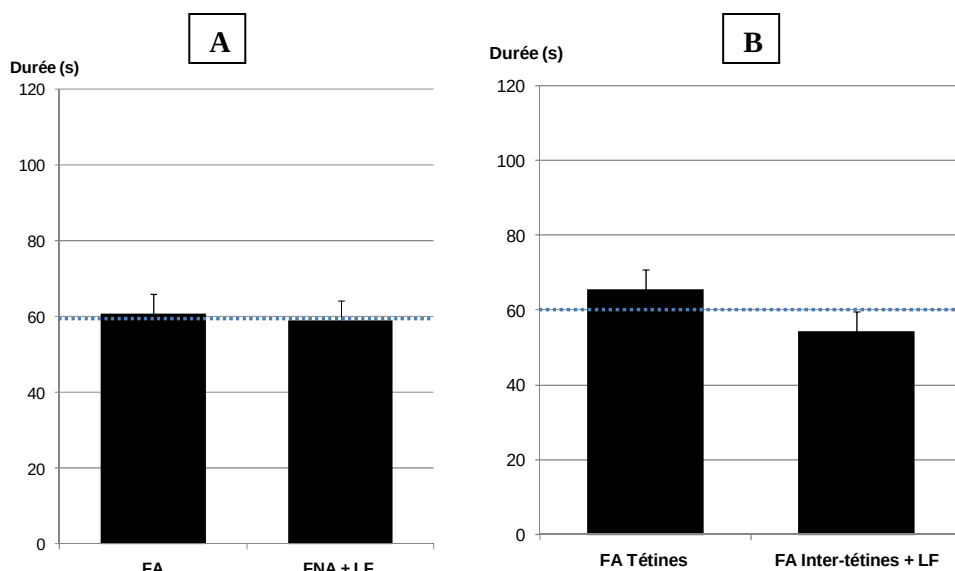


Figure 2. Temps moyen ($\pm$ ES) passé par les souriceaux P6 à explorer chaque stimulus : A) Abdomen de femelle allaitante (FA) vs. Abdomen de femelle non allaitante (FNA) + Lait frais (LF); B) Zone découverte avec tétines d'une femelle allaitante (FA) vs. Zone découverte dépourvue de tétine d'une femelle allaitante (FA) + Lait frais (LF).

Conclusion

Ce résultat peut être expliqué par le fait que le lait puisse être un substrat responsable de l'attraction des souriceaux vers l'abdomen des souris allaitantes, et plus particulièrement, vers leurs tétines.

2) Attraction absolue et relative envers l'odeur de lait murin congelé

But & Méthodologie

Tout d'abord, nous avons évalué l'attraction absolue de l'odeur du lait murin congelé et celle d'un odorant non familier, le lyral (odeur floral), classiquement utilisé comme stimulus olfactif chez les rongeurs (conditions A et B). Pour cela, des échantillons de lait congelé (LC) ou de lyral ont été simultanément exposés à un stimulus témoin, i.e., l'eau. Enfin, nous avons testé l'attraction relative du lait murin en exposant simultanément les souriceaux P6 aux odeurs de lait congelé et de lyral (condition C).

Comme précédemment, l'âge de production du lait était situé entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour de lactation. Par ailleurs, les échantillons de lait ont été congelés entre 8 et 21 jours à -80°C pour la condition A (durée moyenne de 15.7 ± 1.6 jours) et entre 5 et 12 jours à -80°C pour la condition C (durée moyenne de 7.1 ± 0.7 jours).

Six gouttes (14 µL/goutte, soit 84 µL au total) ont été déposées sur un corset en polypropylène suivant une organisation spatiale fixe et un espacement régulier entre les gouttes.

Résultats

Les résultats présentés dans la **Figure 3** montrent, tout d'abord, que l'odeur de lait congelé (L10-L14) est attractive pour les souriceaux P6 ($N=23$, $t= 2.494$; $p=0.021$), alors que l'odeur de lyral ne l'est pas ($N=22$, $t=0.438$; $p=0.666$). Par ailleurs, l'odeur de lait congelé est préférée à celle du lyral lorsque ces deux stimuli sont exposés simultanément ($N=23$, $t=3.064$, $p=0.006$).

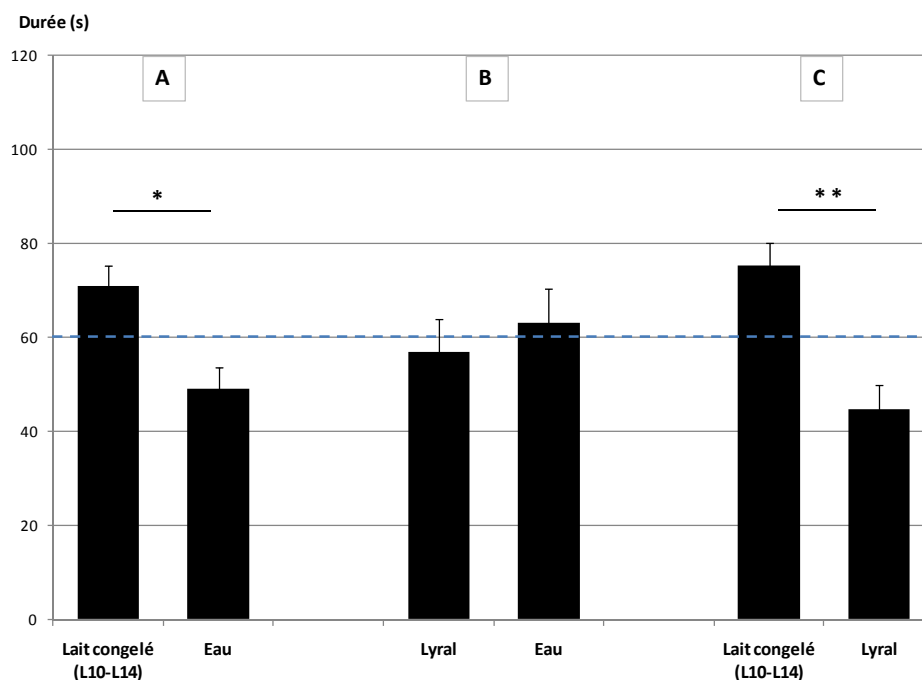


Figure 3. Temps moyen ($\pm$ ES) passé par les souriceaux P6 à explorer chaque stimulus: A) Lait congelé vs. Eau, B) Lyral vs. Eau ; et C) Lait congelé vs. Lyral (test t de Student ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Conclusion

Ces résultats montrent qu'un substrat olfactif, quel qu'il soit, n'est pas forcément attractif pour un souriceau P6. L'odeur de lait même congelé est, quant à elle, préférée à celles des substrats témoin et contrôle, i. e., l'eau et le lyral.

3) Pouvoir attractif du lait murin frais et effet de la congélation

But & Méthodologie

A présent, nous avons évalué le pouvoir attractif du lait frais (LF) pour des souriceaux P6 en présentant simultanément cette odeur lactée face à de l'eau (condition B). Afin de mesurer un éventuel effet de la congélation sur le pouvoir attractif du lait, nous avons également opposé du LF et du LC (condition C). En effet, nous avons précédemment mis en évidence que l'odeur de LC est attractive (condition A) ; la condition C nous permet donc d'examiner si la congélation du lait de souris modifie la qualité et le pouvoir réactogène du lait.

L'âge de production du lait était entre le 10^{ème} et le 14^{ème} jour de lactation. Par ailleurs, les échantillons de lait ont été, soit utilisés frais juste après la traite (10 min au maximum après la traite), soit congelés entre 1 et 8 jours à -80°C pour la condition C (durée moyenne de 5.10 ± 1.1 jours).

Six gouttes de lait (14 μ L/goutte, soit 84 μ L au total) ont été déposées sur un corset en polypropylène suivant une organisation spatiale fixe et un espacement régulier entre les gouttes.

Résultats

Les résultats présentés dans la **Figure 4** illustrent la capacité des souriceaux de 6 jours à détecter et à être attirés par l'odeur du lait de leur espèce. Lorsque le lait est présenté par rapport à de l'eau, les souriceaux P6 se dirigent significativement plus longuement vers l'odeur de lait qu'il soit congelé (N=23, $t= 2.494$; $p=0.021$) ou frais (N=24, $t=2.62$; $p=0.017$). De plus, les souriceaux P6 passent plus de temps vers les odeurs de lait frais par rapport à celles de lait congelé.

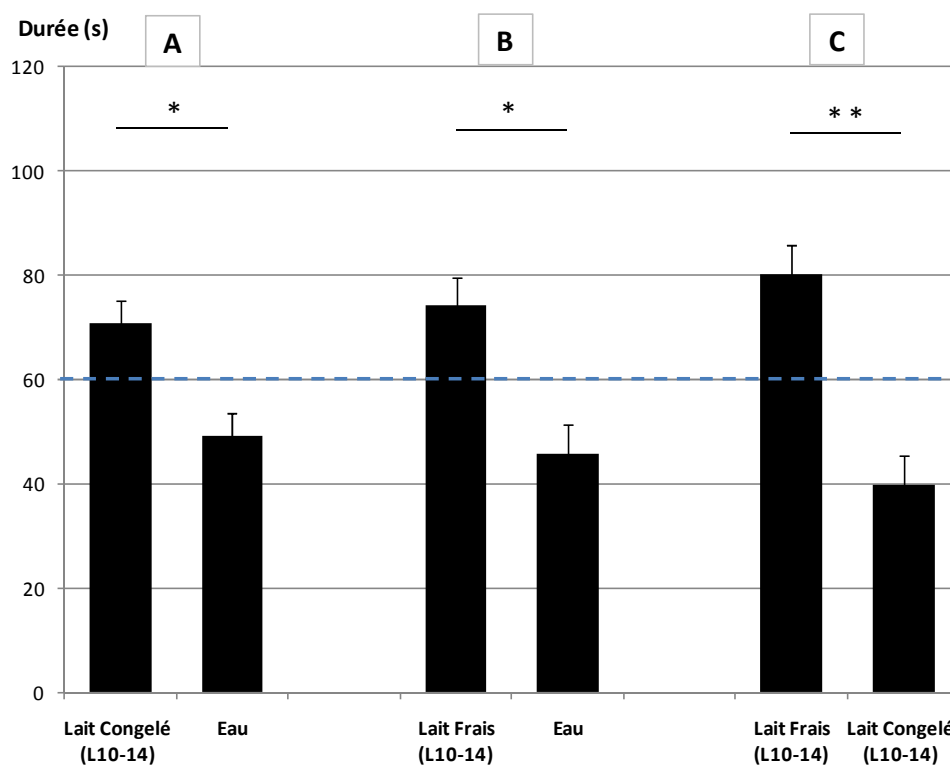


Figure 4. Temps moyen ($\pm$ ES) passé par les souriceaux P6 à explorer chaque stimulus : A) Lait congelé vs. Eau; B) Lait frais vs. Eau ; et C) Lait frais vs. Lait congelé (test *t* de Student ; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Conclusion

Ces résultats indiquent ainsi que la congélation a modifié la composition chimique du lait et a, par la même, altéré le pouvoir attractif du substrat même si celui-ci reste réactogène pour des souriceaux P6.

4) Reconnaissance du lait maternel

But & Méthodologie

Afin d'évaluer la capacité des souriceaux P6 à reconnaître l'odeur du lait de leur propre mère, nous les avons exposés à des odeurs de « lait maternel » et de « lait non maternel », c'est à dire provenant d'une femelle non familière et non apparenté. Les laits provenaient de femelles de même âge lactationnel (i.e., 6^{ème} jour post-partum, L6) et de même régime alimentaire.

Six gouttes de lait frais (14 μ L/goutte, soit 84 μ L au total) ont été déposées sur un corset en polypropylène suivant une organisation spatiale fixe et un espacement régulier entre les gouttes.

Résultats

Les souriceaux P6 ont exploré de façon similaire les deux compartiments odorisés aux laits maternel et non maternel (**Figure 5** ; $N=20$, $t=1.016$, $p=0.942$).

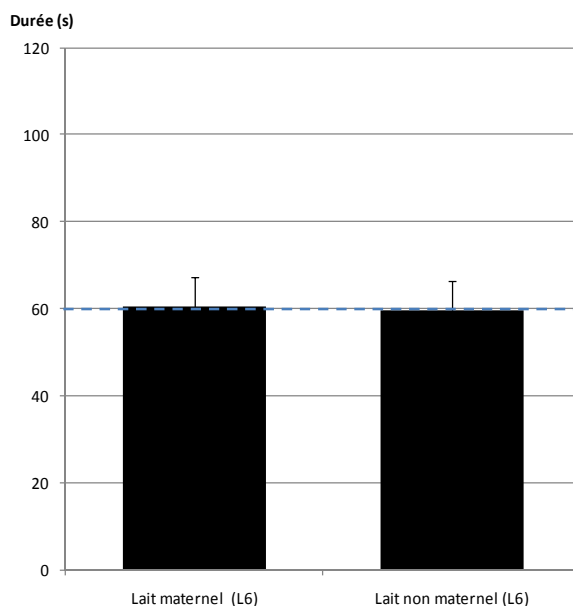


Figure 5. Temps moyen ($\pm$ ES) passé par les souriceaux P6 à explorer chaque stimulus : Lait frais maternel vs. Lait frais non maternel.

Conclusion

Ces résultats peuvent être interprétés de différentes façons : 1) toutes les femelles allaitantes BALB/c au même stade de lactation produisent un lait présentant des propriétés chimio-sensorielles identiques, 2) soit les profils olfactifs des laits maternel et non maternel diffèrent mais les souriceaux n'y sont pas sensibles, 3) ou enfin, les souriceaux perçoivent ces différences olfactives mais n'expriment pas de comportements discriminants dans nos conditions expérimentales.

5) Reconnaissance olfactive du régime alimentaire maternel

But & méthodologie

Cette étude a eu pour but d'évaluer la capacité des souriceaux à exprimer une exploration différentielle envers des laits provenant de femelles allaitantes (non familières et non apparentés) nourries, soit à un régime alimentaire similaire à celui de leur mère, soit à un régime différent de celui de leur mère. Ainsi, cette étude a consisté à exposer les souriceaux à des odeurs de « lait similaire au régime maternel » et de « lait différent du régime maternel ».

Par ailleurs, les deux régimes alimentaires proposés étaient dits : standard (propriétés nutritionnelles standards de laboratoire) ou enrichi (propriétés nutritionnelles avec une teneur accrue en protéines). Les deux laits provenaient de femelles au même âge de lactation (L10-14).

Six gouttes de lait frais (14 μ L/goutte, soit 84 μ L au total) ont été déposées sur un corset en polypropylène suivant une organisation spatiale fixe et un espacement régulier entre les gouttes.

Résultats

Les souriceaux P6 ont exploré les deux stimuli de façon similaire, que le régime maternel soit standard (N=21, $t=0.603$, $p=0.555$) ou enrichi (N=18, $t=1.450$, $p=0.163$) (**Figure 6**).

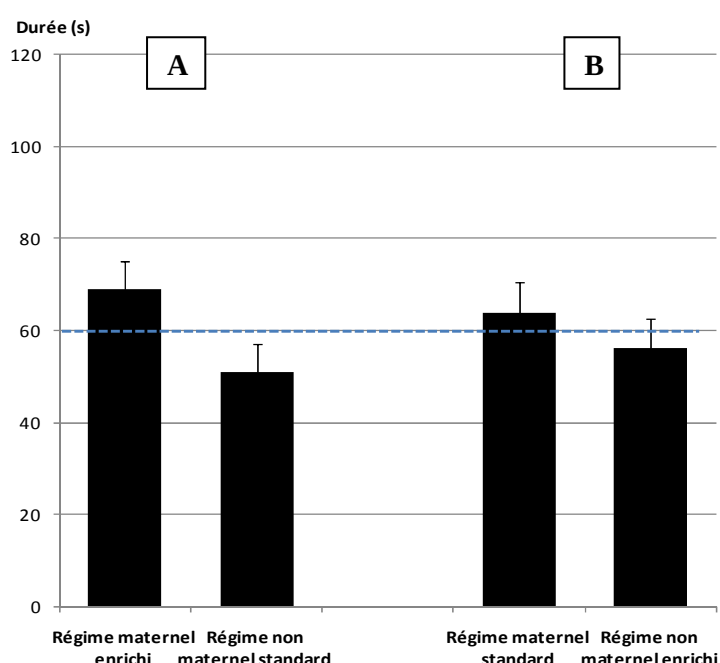


Figure 6. Temps moyen ($\pm$ ES) passé par les souriceaux P6 à explorer chaque stimulus : A) Lait frais identique au régime maternel (i.e., enrichi) vs. Lait frais différent du régime maternel (i.e., standard) ; et 2) Lait frais identique au régime maternel (i.e., standard) vs. Lait frais différent du régime maternel (i.e., enrichi).

Conclusion

Plusieurs interprétations peuvent être proposées pour expliquer ces réponses comportementales indifférenciées: 1) soit les propriétés chimiosensorielles de ces laits restent identiques malgré des régimes alimentaires différents ; 2) soit, les profils olfactifs des laits varient en fonction du régime alimentaire mais les souriceaux n'y sont pas sensibles ; ou 3) les souriceaux perçoivent ces fluctuations olfactives mais n'expriment pas d'exploration différentielle entre ces stimuli.

ANNEXE 2

SAISIE DE TETINE DE FEMELLES ALLAITANTES A DIFFERENTS AGES LACTATIONNELS PAR DES SOURICEAUX P1 (compléments section II.2)

But & méthodologie

Nous avons testé si les tétones de femelles allaitantes au cours de la lactation émettaient des odeurs réactogènes pour des souriceaux P1. Durant un test de 2 min, le museau des souriceaux P1 a été mis en contact léger avec une tétine de femelle allaitante non familière au 1^{er} jour post-partum (N=23) ou au 10^{ème} jour post-partum (N=22).

Résultats

Les résultats sont représentés dans la **figure 7**.

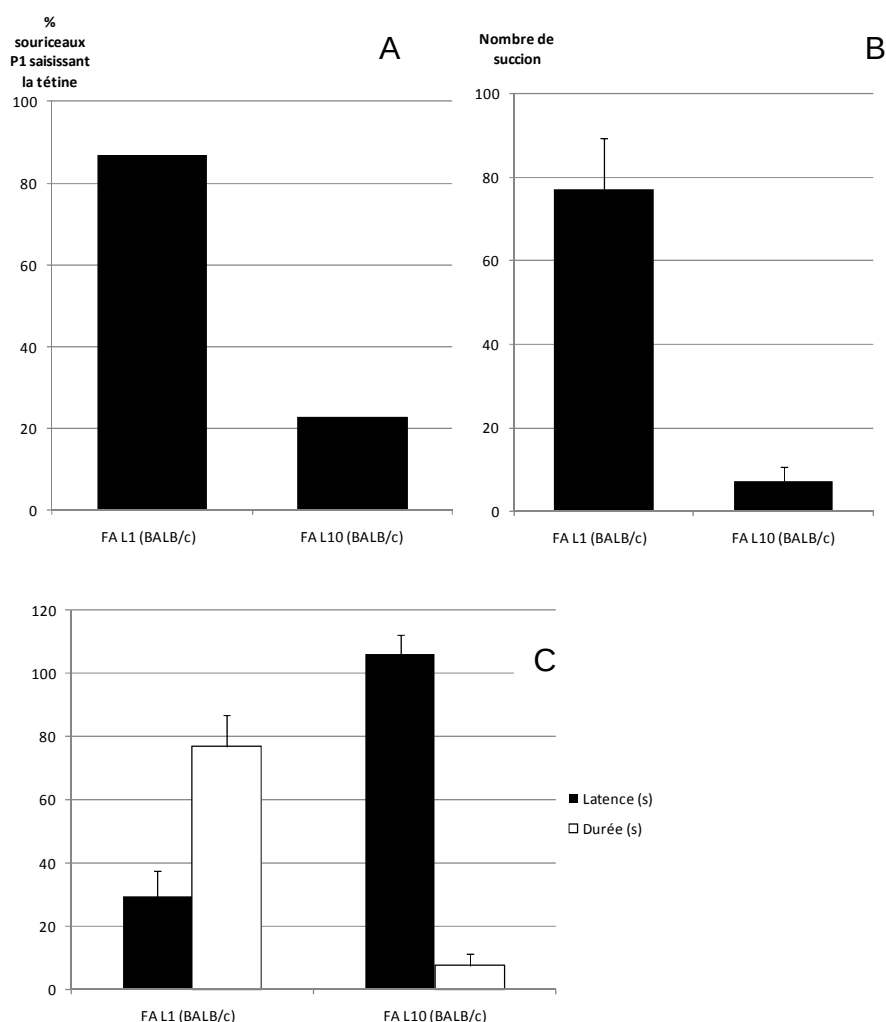


Figure 7. Réponses orales des souriceaux P1 lors d'un test de saisie d'une tétine de FA au 1^{er} jour post-partum (FAL1) ou au 10^{ème} jour postpartum (FAL10). (A) Pourcentage de souriceaux saisissant une tétine de FA ; (B) Nombre de mouvements oraux lors de la saisie (moyenne ± ES) ; (C) Latence avant la première saisie (moyenne ± ES) ; (D) Durée de saisie (moyenne ± ES).

Conclusion

Les réponses orales des souriceaux P1 lors d'un test de saisie d'une tétine de FA au 10^{ème} jour postpartum (FAL10) sont très faibles et sont similaires à celles rapportées pour une tétine de femelle non allaitante. Une tétine de FAL10 apparaît véhiculer peu de composés olfactifs réactogènes pour des souriceaux P1.

ANNEXE 3

LES CAPACITES D'APPRENTISSAGE ASSOCIATIF CHEZ LES SOURICEAUX P0-P1 (compléments section II.3)

1) Apprentissage olfactif associé à l'expérience de tétée à P0-P1

a) Expérience A

But

L'expérience A se propose de tester l'effet de deux puis d'une seule association entre le limonène et la tétée chez des souriceaux P1.

Phase d'apprentissage et de test

Le pattern d'exposition de l'odorant, le limonène, en association avec la tétée (**Figure 8**), consiste soit en deux expositions de deux heures (pattern 1), soit en une seule exposition d'une heure (pattern 2). Deux groupes expérimentaux de souriceaux sont exposés au limonène $6,06.10^{-2}M$ en association avec la tétée : l'un selon le pattern 1 (n=19), l'autre selon le pattern 2 (n=20). Un groupe de souriceaux témoin (n=20) est exposé à l'eau selon le pattern 1.

Après la phase d'apprentissage, tous les souriceaux sont soumis à un test de saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène $6,06.10^{-2}M$ pendant 2 min. Le temps de rétention entre l'apprentissage et le test est d'une heure.

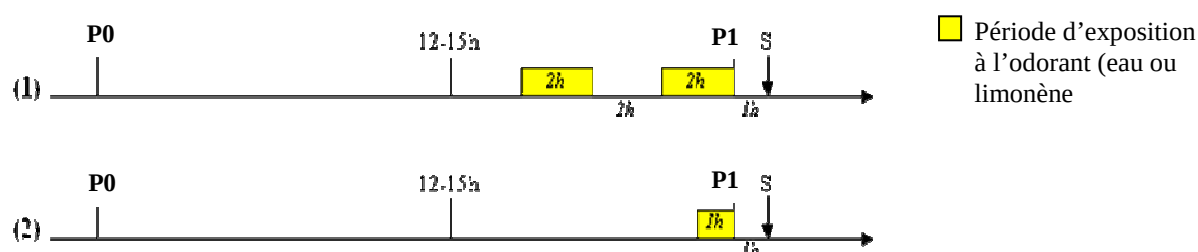


Figure 8. Patterns d'exposition des souriceaux au limonène $6,06.10^{-2}M$ ou à l'eau. P0 : naissance ; P1 : premier jour de vie post-partum (24-36h) ; S : test de saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène $6,06.10^{-2}M$.

Résultats

Comme le montre la **Figure 9**, exposer des souriceaux au limonène $6,06.10^{-2}M$ en association avec deux fois deux heures de tétée (barres grises) a permis de déclencher des réponses de saisie orale significativement différentes de celles du groupe témoin exposé à l'eau pendant l'apprentissage (barres blanches). Le groupe expérimental exprime des réponses orales de

saisie plus fréquentes (Figure 9A, $p = 0.026$), un temps de latence de saisie plus court (Figure 9C, $U = 268$, $p = 0.019$) et une durée de saisie plus longue (Figure 9D, $U = 124$, $p = 0.048$).

Au contraire, les souriceaux exposés au limonène $6,06.10^{-2}M$ au cours d'une seule tétée d'une heure (barres noires) expriment des réponses comportementales de saisie orale similaires à celles observées chez le groupe témoin, exposé à l'eau pendant la phase d'apprentissage.

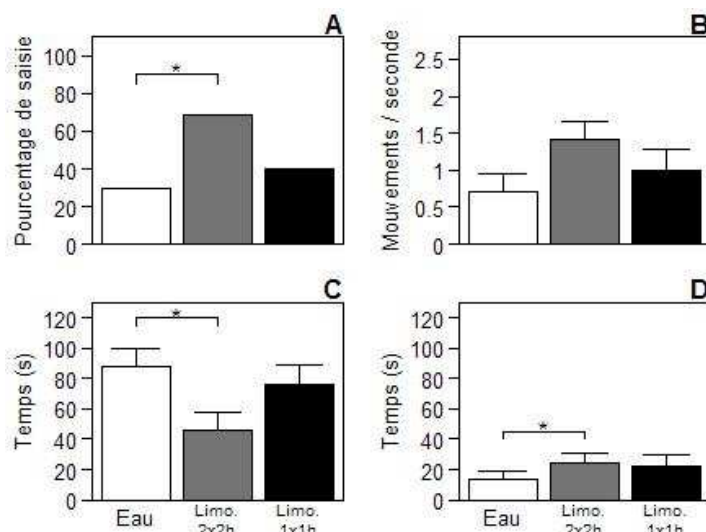


Figure 9. Réponses orales des souriceaux à P1 lors d'un test de saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène $6,06.10^{-2}M$, suite à deux fois deux heures (barres grises) ou une fois une heure (barres noires) d'association entre un odorant (limonène $6,06.10^{-2}M$) ou un contrôle (eau) et le contexte de tétée et après une heure de rétention. (A) Pourcentage de souriceaux saisissant une tétine de FNA ; (B) Nombre de mouvements oraux lors de la saisie (moyenne $\pm$ ES) ; (C) Latence de saisie (moyenne $\pm$ ES) ; (D) Durée de saisie (moyenne $\pm$ ES). * $p < 0.05$.

Conclusion

Une phase d'apprentissage associant le limonène à deux fois deux heures de tétée a permis de déclencher la saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène une heure après la dernière association. Cependant, une seule exposition d'une heure au limonène en association avec la tétée ne semble pas être suffisante pour que le limonène acquière le pouvoir inducteur de saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène.

b) Expérience B

L'expérience B se propose de tester l'effet de deux associations de deux heures entre le limonène et la tétée chez des souriceaux P0.

Phase d'apprentissage et de test

Le pattern d'exposition à l'odorant en association avec la tétée à P0 (**Figure 10**) consiste en deux expositions de deux heures ; la première exposition débutant avant que la première tétée ne soit initiée et après que tous les nouveau-nés soient nés (N=16).



Figure 10. Pattern d'exposition des souriceaux P0 au limonène $6,06 \cdot 10^{-2} M$. P0 : naissance ; P1 : premier jour de vie post-partum (24-36h) ; S : test de saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène $6,06 \cdot 10^{-2} M$.

Résultats

Nous avons mis évidence que 56% (9/16) des souriceaux P0 testés ont saisi une tétine de FNA odorisées au limonène et la latence avant la première saisie de tétine était de 61.03 s (± 13.51 s). La durée moyenne de saisie de la tétine était de 21.32 s (± 7.10 s) et le nombre moyen de mouvements de succion était de 37.56 (± 12.11), d'où une vitesse de succion de 1.07 mouvement/s (± 0.25 mvt/s) en moyenne sur les 2 min de test.

Conclusion

Ces résultats suggèrent que les souriceaux à la naissance sont capables d'associer un odorant neutre avec une expérience de tétée de deux fois deux heures. Ce groupe expérimental doit néanmoins être complété et un groupe témoin de souriceaux exposés à l'eau (stimulus témoin) doit être testé pour pouvoir réellement conclure sur cette capacité néonatale.

2) L'odeur du lait : Stimulus renforçateur des apprentissages olfactifs ?

Nous avons mis en évidence une situation expérimentale dans laquelle l'apprentissage associatif entre un odorant et le contexte de tétée est possible. Cependant, le contexte de tétée est très complexe et englobe de nombreux facteurs (présence de la mère, chaleur, ingestion de lait et renforcement post-ingestif, odeur de lait, etc.). Chez la souris, nous pouvons nous interroger sur la nature des facteurs qui ont permis d'induire ce type d'apprentissage. Est-ce

l'ingestion de lait et le renforcement post-ingestif qui suit ? Est-ce simplement l'odeur du lait ? Afin de répondre à ces questions, les expériences C et D se proposent de tester l'effet d'une exposition au limonène, en association avec l'odeur de lait (renforcement olfactif), sur la réponse de saisie orale des souriceaux P1 exposés à une tétine de FNA odorisée au limonène.

a) Expérience C : Exposition collective

Groupes expérimentaux

Cette expérience comporte trois groupes expérimentaux. Un premier groupe de souriceaux est exposé au limonène 10^{-6} M et à l'odeur du lait afin de tester le potentiel pouvoir renforçateur de l'odeur du lait lors d'un apprentissage associatif (n=16). Un second groupe est exposé uniquement au limonène 10^{-6} M et servira de contrôle pour s'assurer qu'un odorant devenu familier ne déclenche pas le comportement de saisie d'une tétine (n=19). Enfin, un troisième groupe de souriceaux est exposé uniquement à l'eau et servira de témoin pour vérifier que le limonène n'induit pas de comportement spontané de saisie d'une tétine suite à cette procédure (n=19). Chacun des trois groupes est soumis à la même procédure d'exposition (décrite ci-dessous) ; seul l'odorant varie.

Procédure générale d'exposition collective

La procédure générale d'exposition consiste à isoler la mère de la portée pendant deux heures pour motiver les petits à téter, puis à exposer les souriceaux au stimulus odorant pendant une durée de cinq minutes (**Figure 11**). L'exposition est collective et se fait à l'aide d'une cloche d'exposition (**Figure 12**). Cette cloche est constituée d'une boîte de pétri retournée. Un carré (2,5 x 2,5 cm) de papier absorbant inodore (absorbant universel, 3M PowerSorb p-110) est scotché sur le haut de la cloche. Un volume de 50 μ l de chaque odorant est déposé sur ce carré en prenant soin de ne pas mélanger les gouttes. Le haut de la cloche est percé de trous afin de permettre l'aération du dispositif. Lors de cette exposition collective, le père est retiré de la cage pour éviter qu'il ne perturbe l'installation. Durant toute la procédure, la cage est placée sur une plaque chauffante réglée à 40°C pour éviter une hypothermie des nouveau-nés. Le test de saisie de tétine de FNA odorisée au limonène 10^{-6} M est réalisé 1h après la fin de la phase d'exposition.



Figure 11. Pattern d'exposition des souriceaux au limonène 10^{-6} M et à l'odeur de lait, uniquement au limonène 10^{-6} M ou à l'eau pendant cinq minutes. P0 : naissance ; P1 : premier jour de vie post-partum (24-36h) ; S : test de saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène 10^{-6} M.

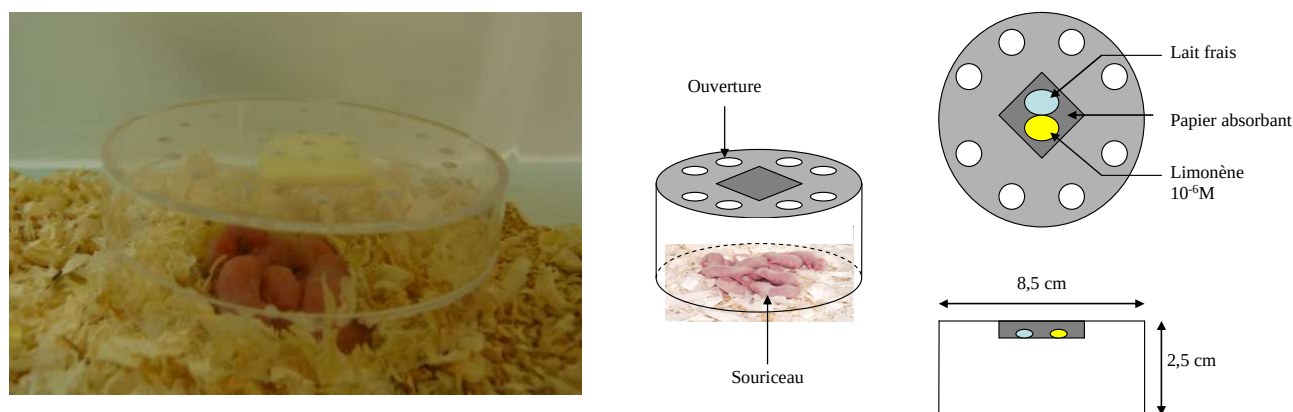


Figure 12. Schéma de la cloche d'exposition olfactive utilisée pour l'exposition collective des souriceaux P1.

Résultats

Les résultats sont présentés en **Figure 13**. Après une exposition collective de cinq minutes, les souriceaux exposés au limonène $10^{-6}M$ en association avec l'odeur de lait expriment une réponse comportementale de saisie orale similaire à celle observée chez les groupes témoins et contrôle dans nos conditions expérimentales.

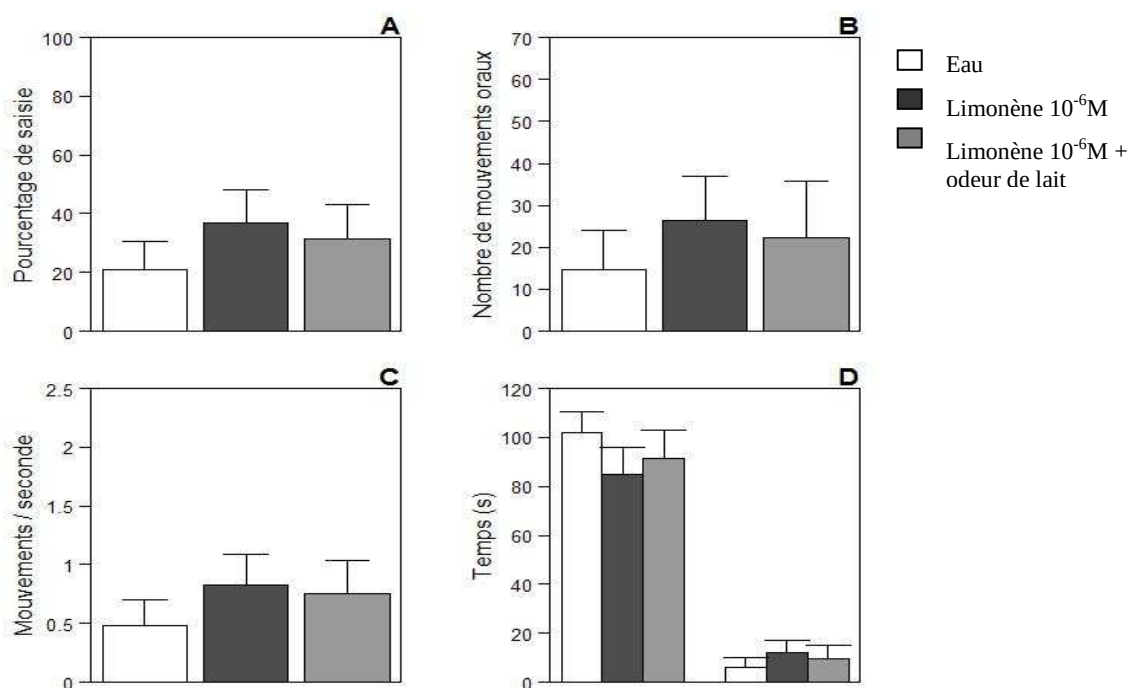


Figure 13. Réponses orales des souriceaux P1 (Moyenne $\pm$ ES) après 1h de rétention, lors d'un test de saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène. (A) Pourcentage de souriceaux saisissant une tétine de FNA ; (B) Nombre total de mouvements oraux lors de la saisie ; (C) Nombre de mouvements oraux par seconde ; (D) Latence (gauche) et Durée (droite) de saisie de la tétine.

Conclusion

Dans nos conditions expérimentales, l'odeur du lait associée à celle du limonène n'a pas suffi à conditionner le comportement de saisie de tétine d'une tétine de FNA odorisée au limonène.

b) Expérience D : Exposition individuelle

Groupes expérimentaux

Cette expérience comporte trois groupes expérimentaux. Un premier groupe de souriceaux est exposé au limonène $6,06.10^{-6}M$ et à l'odeur du lait afin de tester le potentiel pouvoir renforçateur de l'odeur du lait lors d'un apprentissage associatif ($n=20$). Un second groupe est exposé uniquement au limonène $6,06.10^{-6}M$ et servira de contrôle pour s'assurer qu'un odorant devenu familier ne déclenche pas le comportement de saisie d'une tétine ($n=17$). Enfin, un troisième groupe de souriceaux est exposé uniquement à l'eau et servira de témoin pour vérifier que le limonène n'induit pas de comportement spontané de saisie d'une tétine suite à cette procédure ($n=20$).

Phase d'apprentissage et de test

La procédure générale d'exposition au limonène, en association avec l'odeur de lait, consiste 1) à isoler la mère de la portée pendant deux heures pour motiver les petits, 2) à déposer le souriceau dans une coupelle en plastique (diamètre = 5,5 cm) contenant de la litière du nid pendant cinq minutes pour qu'il s'habitue à l'environnement d'exposition, 3) à maintenir le souriceau sur le ventre en appuyant délicatement avec deux doigts sur ses omoplates, 4) à lui présenter, à 2 mm de son museau, deux cotons tiges accolés sur lesquels sont déposés le ou les odorant(s) et 5) à le replacer dans le nid avec le père pendant une heure (temps de rétention). Pendant les phases d'habituation et d'exposition, la coupelle contenant le petit est placée sur une plaque chauffante (35°C) pour éviter toute hypothermie du nouveau-né (**Figure 14**).

Afin d'éviter une trop grande détérioration de ce stimulus olfactif lors de la phase d'apprentissage, la durée d'exposition a donc été fixée à cinq minutes.



Figure 14. Phase d'exposition des stimuli olfactifs à un souriceau P1.

Après la phase d'apprentissage, tous les souriceaux sont soumis à un test de saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène $6,06.10^{-6}M$. Le temps de rétention entre l'apprentissage et le test est d'une heure.

Résultats

Les résultats sont présentés en **Figure 15**. Une exposition de cinq minutes à P1 au limonène $6,06.10^{-6}M$ en association avec l'odeur de lait (barres noires) suffit pour induire des réponses comportementales de saisie orale significativement différentes de celles du groupe témoin, exposé à l'eau pendant l'apprentissage (barres blanches). En effet, le groupe expérimental exprime des réponses plus fréquentes (Figure 14A, $p = 0.048$), un temps de latence de saisie plus court (Figure 14C, $U = 271$, $p = 0.028$) et une durée de saisie plus longue (Figure 14D, $U = 129$, $p = 0.028$). Bien qu'il ne soit pas significativement différent du groupe contrôle, le nombre de mouvements oraux pendant la saisie a lui aussi tendance à être plus important chez le groupe expérimental (Figure 14B, $U = 140$, $p = 0.064$).

Dans les mêmes conditions, une exposition au limonène $6,06.10^{-6}M$ seul (barres grises) suffit également à induire des réponses comportementales de saisie orale significativement différentes de celles du groupe témoin, exposé à l'eau pendant l'apprentissage (barres blanches). En effet, le groupe expérimental exprime des réponses plus fréquentes (Figure 14A, $p = 0.003$), un plus grand nombre de mouvements oraux lors de la saisie (Figure 14B, $U = 95$, $p = 0.012$), un temps de latence de saisie plus court (Figure 14C, $U = 265$, $p = 0.0014$) et une durée de saisie plus longue (Figure 14D, $U = 84$, $p = 0.004$).

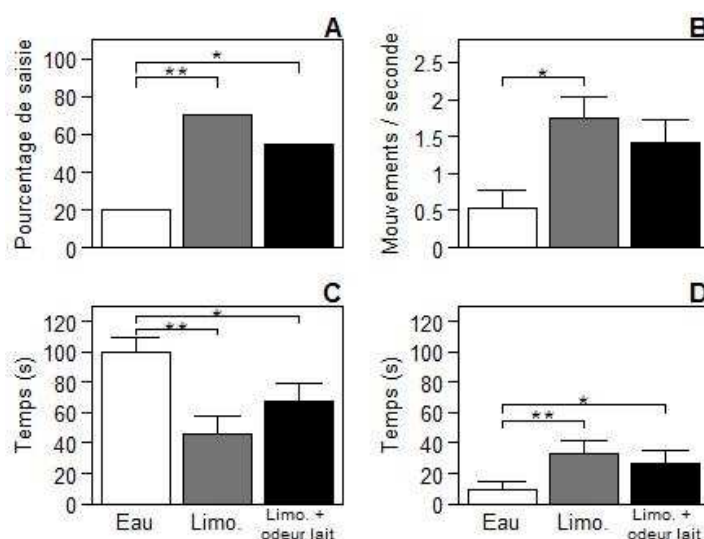


Figure 15. Réponses orales des souriceaux P1 lors d'un test de saisie d'une tétine de FNA odorisée au limonène $6,06.10^{-6}M$, suite à cinq minutes d'association entre un odorant (limonène $6,06.10^{-6}M$) et l'odeur de lait (barres noires), ou cinq minutes d'exposition à un contrôle (limonène $6,06.10^{-6}M$ seul, barres grises) ou à un témoin (eau, barres blanches) et après une heure de rétention. (A) Pourcentage de souriceaux saisissant une tétine de FNA ; (B) Nombre de mouvements oraux lors de la saisie par seconde (moyenne $\pm$ ES) ; (C) Latence de saisie (moyenne $\pm$ ES) ; (D) Durée de saisie (moyenne $\pm$ ES). ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

Conclusion

Les résultats de cette expérience montrent qu'une exposition de cinq minutes au limonène en association avec l'odeur de lait permet à cet odorant d'acquérir le pouvoir inducteur de la saisie d'une tétine de FNA. Ce résultat semble montrer que l'odeur du lait pourrait intervenir en tant que renforçateur lors de cet apprentissage. Cependant, dans le contexte thermo-tactile d'apprentissage de l'Expérience D, une exposition uniquement au limonène $10^{-6}M$ permet également d'induire cette réponse de saisie orale. Deux hypothèses pourraient expliquer ces résultats. La première serait que le limonène ait acquis le pouvoir inducteur de la tétée par un mécanisme cognitif d'apprentissage non associatif : l'habituation. La seconde hypothèse serait que la méthode et le contexte d'apprentissage *per se* soient renforçants. En effet, les souriceaux sont dans un environnement connu (litière du nid), sur une plaque chauffante (stimulation thermique) et maintenu sur cette plaque avec deux doigts (stimulation tactile).

ANNEXE 4

EXPLORATION PRÉFÉRENTIELLE DES SOURICEAUX BALB/C P6 ENVERS DES LAITS EXTRAITS A DIFFÉRENTS STADES DE LACTATION (compléments section III.1)

But & Méthodologie

Ces expériences ont pour but d'évaluer les préférences olfactives des souriceaux P6 face à des laits produits à différents stades de lactation.

Les souriceaux P6 sont introduits dans une arène rectangulaire à double-choix olfactif pendant 2 min. Le temps passé à explorer chacune des deux zones odorisées a été comptabilisé, soit 1) un lait âgé entre 6h et 32h post-partum (L0-L1) par rapport à un lait âgé de 6^{ème} jour post-partum (L6-L7), ou 2) un lait âgé entre 48h et 72h post-partum (L2-L3) par rapport à un lait âgé de 6 jour post-partum (L6-L7).

Résultats

Les résultats sont représentés dans la **Figure 16**.

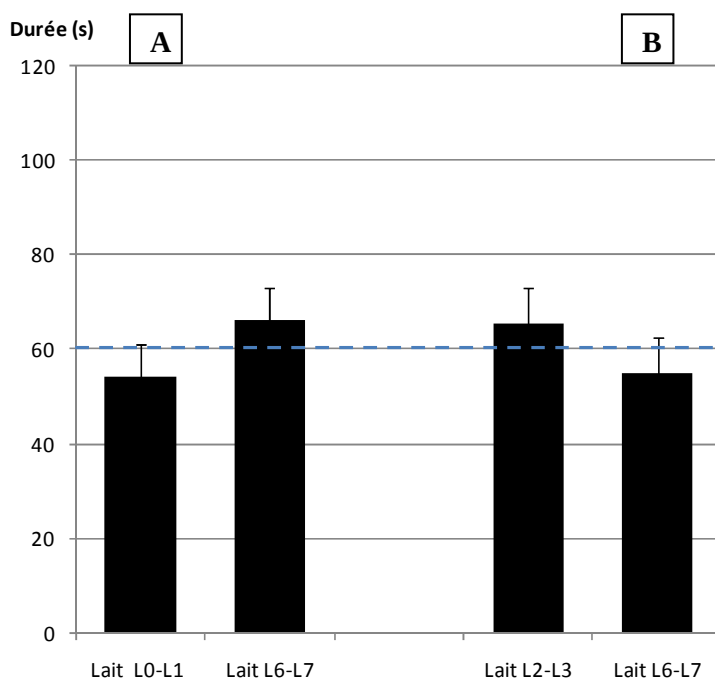


Figure 16. Durée moyenne ($\pm$ ES) passée dans un test d'arène à double choix-olfactif pour des souriceaux de 6 jours (P6) exposés à : A) un lait extrait entre les 6h et 36h post-partum (L0-L1) vs. un lait extrait au 6^{ème} jour post-partum (L6-L7); B) un lait extrait entre 48h et 72h post-partum (L2-L3) vs. un lait extrait au 6^{ème} jour post-partum (L6-L7). La ligne en pointillée indique une orientation aléatoire.

Conclusion

Les souriceaux P6 expriment des réponses d'exploration similaires envers les stimuli lactés suivants : L0-L1, L2-L3, et L6-L7. Ces réponses comportementales indifférenciées pourraient révéler une absence de fluctuation du profil olfactif du lait entre le 1^{er} et le 6-7^{ème} jour post-partum et entre le 2-3^{ème} jour et le 6-7^{ème} jour post-partum. Néanmoins, une précédente étude (voir section III.2) a montré que les souriceaux de 8-15 h de vie étaient capables de discriminer entre certaines périodes de lactation et préféraient l'odeur d'un lait produit le 1^{er} jour post-partum par rapport à des laits produits au 3^{ème} jour ou 15^{ème} jour post-partum, soulignant ainsi des fluctuations des propriétés chimio-sensorielles du lait au cours de la lactation. Une autre explication serait que le lait puisse être chargé d'une plus grande quantité de composés olfactifs actifs /attractifs au cours de la première semaine de lactation afin de faciliter la prise lactée des souriceaux d'âges précoces. Enfin, un mécanisme d'apprentissage pourrait également opérer. En effet, les souriceaux âgés de 6 jours ont déjà ingéré et donc expérimenté les laits de la première semaine de lactations (L0 à L6). L'odeur de ces laits a donc pu être mémorisée grâce à l'association renforçante des nombreuses tétées (renforcements ingestif et post-ingestif).

ANNEXE 5

ORIENTATION PREFERENTIELLE DES SOURICEAUX BALB/C P2 ENVERS DES ODEURS DE LAITS ISSUS DE FEMELLES DE DIFFERENTES LIGNEES (compléments section III.3)

But & Méthodologie

Ces deux expériences ont pour but d'évaluer les préférences olfactives des souriceaux BALB/c P2 face à des laits issus de femelles provenant de différentes lignées : leur propre lignée BALB/c et la lignée C57BL/c. L'objectif est de tester la capacité des souriceaux de lignée BALB/c de 2 jours à discriminer: 1) entre les odeurs de laits BALB/c et C57 extraits au 2^{ème} jour post-partum, et 2) entre les odeurs de laits BALB/c et C57 extraits au 15^{ème} jour post-partum.

Les souriceaux sont soumis à un test d'orientation céphalique de 2 min.

Résultats

Dans le test opposant les laits de lignées BALB/c et C57 prélevés au 2^{ème} jour de lactation, les souriceaux P2 passent plus de temps vers l'odeur de lait C57 que vers l'odeur de leur propre lignée (**Figure 17** ; $t = -2,270$; $p = 0,033$). Cependant, ils dirigent leur museau de façon aléatoire lorsque des laits de lignées BALB/c et C57 de lactation tardive L15 sont présentés simultanément ($t = 0,650$; $p = 0,521$).

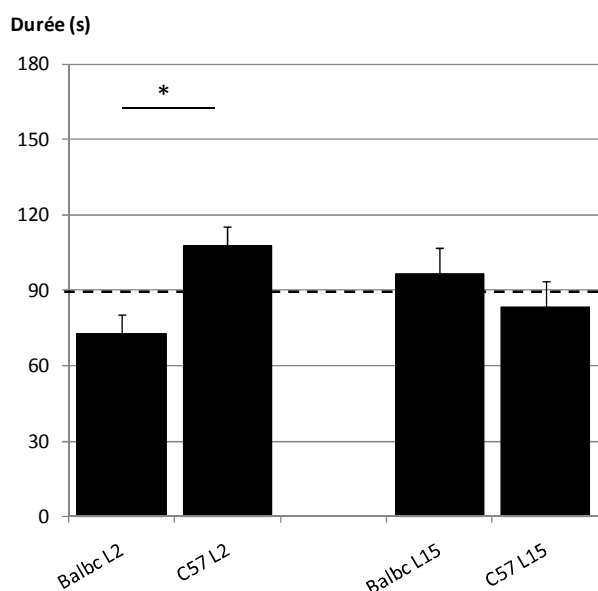


Figure 17. Durée moyenne ($\pm$ ES) passée dans un test d'orientation céphalique à double choix-olfactif pour des souriceaux de 2 jours : A) lait de souris BALB/c au 2^{ème} jour post-partum (BALB/c-L2) vs. lait de souris C57BL/6 au 2^{ème} jour post-partum (C57-L2); et B) lait de souris BALB/c au 15^{ème} jour post-partum (BALB/c-L15) vs. lait de souris C57BL/6 au 15^{ème} jour post-partum (C57-L15). Tests t de Student, * $p < 0.05$. La ligne en pointillée indique une orientation aléatoire.

Conclusion

Ces résultats signifient que le lait émet une signature olfactive spécifique de la lignée au 2^{ème} jour de lactation, perçue par les souriceaux BALB/c P2, et que la lignée C57 produirait des composés volatiles plus actifs que ceux émis par la lignée BALB/c au 2^{ème} jour de lactation. Néanmoins, les laits de lignées BALB/c et C57 de lactation tardive sont, quant à eux, considérés comme équivalents par les souriceaux P2 BALB/c, soit parce que leurs propriétés chimio-sensorielles sont similaires, soit parce que les souriceaux ne sont pas sélectifs face à des laits non familiers (non appareillés en termes d'âge et de lignée).

ANNEXE 6

MESURES THERMIQUES

Température (°C)	Cage normale			Cage sur plaque chauffante (40°C)		
Mesures au sein de la cage hors du nid		26.40 °C			30.50 °C	
		26.30 °C			30.70 °C	
		26.00 °C				
Mesures au sein du nid		32.00 °C			36.00 °C	
		30.20 °C			36.00 °C	
		32.00 °C				
	Avec parents	15 min sans parents	30 min sans parents	Avec parents	15 min sans parents	30 min sans parents
Mesures sur les souriceaux au sein du nid	36.40 °C	34.40 °C	33.70 °C	37.00 °C	36.60 °C	36.60 °C
	36.50 °C	34.60 °C	33.80 °C	37.00 °C	36.00 °C	36.70 °C
	36.50 °C	33.00 °C	34.00 °C		36.20 °C	

ANNEXE 7

VALORISATION DU PROJET DE THESE

Publications dans des revues ou ouvrages à comité de lecture

Al Aïn S., Chraïti, A., Schaal B. & Patris B. (2011). Orientation of newborn mice to lactating females: Biological substrates of semiochemical interest. *Developmental Psychobiology*, doi: 10.1002/dev.21003.

Al Aïn S., Belin, L., Patris B., & Schaal B. (2012a). An odor timer in milk? Synchrony in the odor of milk effluvium and neonatal chemosensation in mice. *Public Library of Science ONE*, 7, e47228. doi: 10.1371/journal.pone.0047228.

Al Aïn S., Belin, L., Schaal, B. & Patris, B. (2012b). How a newly born mouse gets to the nipple? Odor substrates eliciting first nipple grasping and sucking responses. *Developmental Psychobiology*, doi: 10.1002/dev.21082.

Al Aïn S., Mingioni, M., Patris, B., & Schaal, B. (*en préparation*). The initial response of newly born mice to the odors of murine colostrum and milk: Unconditionally attractive, but conditionally discriminated

Patris, B., Al Aïn, S., & Schaal, B. (2013). Testing olfaction when it is really vital: behavioral assays of olfaction for newborn and infant mice. In: K. Touhara (Ed.), *Pheromone signaling: Methods and Protocols*. Humana Press-Springer, New York. (revue)

Patris, B., Al Aïn, S., & Schaal, B. (2013). Suckling Odours in Murid Rodents: Biological Substrates That Guide Newborns to the Nipple. In: East, Marion L; Dehnhard, Martin (Eds.), *Chemical Signals in Vertebrates XII*. Springer, New York (revue).

Communications internationales et nationales

Al Aïn, S., Belin, L., Patris, B., & Schaal, B. (23-27 juin 2012). Communication affichée : Milk is time! Young mouse pups prefer milk odour from early rather than from late lactation. XVI International Symposium on Olfaction and Taste, Stockholm, Suède.

Al Aïn, S., Patris, B., & Schaal, B. (11 mai 2012). Communication orale : Sélectivité du souriceau face à l'odeur du lait murin prélevé à différents stades de lactation. Colloque de la Société Française pour l'Etude du Comportement Animal, SFECA, Saint-Etienne, France.

Al Aïn, S., Belin, L., Patris, B., & Schaal, B. (8-12 nov. 2011). Communication affichée : Mouse pup selectivity to the odor of murine milk sampled at different lactational stages. 44th Annual Meeting on International Society for Developmental Psychobiology, Washington, USA.

Belin, L., Al Aïn, S., Schaal, B., & Patris, B. (8-12 nov. 2011). Communication affichée : Which odour substrates induce nipple grasping at birth in newborn mice? 44th Annual Meeting on International Society for Developmental Psychobiology, Washington, USA.

Al Aïn, S., Patris, B., & Schaal, B. (26 octobre 2011). Communication orale : Ce que le souriceau perçoit de l'écologie chimique maternelle. GDR D'Ecologie Chimique, Dijon, France.

Al Aïn, S., Belin, L., Schaal, B., & Patris, B. (28 août-31 sept. 2011). Communication affichée : Odour substrates that induce nipple grasping in newborn mice. 12th Meeting on Chemical Signals in Vertebrates, Berlin, Allemagne.

Al Aïn, S., Chraïti, A., Schaal, B., & Patris, B. (14-19 sept. 2010). Communication affichée : An exploration of mammary odor cues in newborn mice. XXth International Congress on the European Chemoreception Research Organisation, Avignon, France.

Oostindjer, M., Al Aïn, S., Patris, B., Cadiou, H., Grosmaître, X., & Schaal, B. (14-19 sept. 2010). Communication affichée : Psychobiological effects of perinatal exposure to odorants in mice. Part II: Behavioural alterations. XXth International Congress on the European Chemoreception Research Organisation? Avignon, France.

Communications locales

Al Aïn, S., Chraïti, A., Patris, B., & Schaal, B. (17 juin 2011). Communication orale : Des odeurs maternelles impliquées dans le comportement de tétée. XVII^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France.

Al Aïn, S., Patris, B., & Schaal, B. (8 déc. 2011). Communication orale : Apprendre à se servir de son nez pour bien grandir ! Journée des Doctorants (CSGA), Dijon, France.

Al Aïn, S., Chraïti, A., Schaal, B., & Patris, B. (17 déc. 2010). Communication orale : L'irrésistible parfum de la mère: Chez la souris aussi ! Journée des Doctorants (CSGA), Dijon, France.

Al Aïn, S., Chraïti, A., Schaal, B., & Patris, B. (7-8 juin 2010). Communication affichée : L'orientation vers la tétine chez le souriceau: Implication de l'odeur du lait. XVI^{ème} Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France.

Résumés publiés de congrès (Proceedings)

Al Aïn S., Belin, L., Patris B., & Schaal, B. (2011). Mouse pup selectivity to the odor of murine milk sampled at different lactational stages. Abstracts: International Society for Developmental Psychobiology. *Developmental Psychobiology*, 53, 738.

Belin, L., Al Aïn S., Schaal, B., & Patris B. (2011). Which odour substrates induce nipple grasping at birth in newborn mice? Abstracts: International Society for Developmental Psychobiology. *Developmental Psychobiology*, 53, 740.

Al Aïn, S., Chraïti, A., Schaal, B., & Patris, B. (2011). An exploration of mammary odor cues in newborn mice. Abstracts from the XXth Congress of European Chemoreception Research Organization, ECRO-2010, Avignon, France. *Chemical Senses*, 36, E53.

Oostindjer, M., Al Aïn S., Patris, B., Cadiou, H., Grosmaître, X., & Schaal, B. (2011). Psychobiological effects of perinatal exposure to odorants in mice. Part II: Behavioural alterations. Abstracts from the XXth Congress of European Chemoreception Research Organization, ECRO-2010, Avignon, France. *Chemical Senses*, 36, E76.

COMMUNICATIONS

1) Publication - Chemical Signals in Vertebrates XII (2013)

Chapter 6

Suckling Odours in Rats and Mice: Biological Substrates that Guide Newborns to the Nipple**Bruno Patris, Syrina Al Ain, and Benoist Schaal**

Abstract It is a general strategy for mammalian females to emit odour signals to direct their offspring to the mammae and to motivate their suckling. The survival of newborns depends on their own capacities to exploit the cues emitted by their mother, or by conspecific lactating females, and to direct their behaviour to the vital targets on the mother's body - the nipples. This chapter synthesises data on some natural substrates that contribute to nipple searching and grasping in the newborns of (laboratory strains of) two phylogenetically-close species, *Rattus norvegicus* and *Mus musculus*.

6.1 Introduction

To survive, all mammalian neonates have to interact efficiently with the mother (and in rare cases with the father) to simultaneously obtain care and protection, as well as energetic, nutritional, protective, and informational resources. To reach these resources, infants depend on their own neural and motor capacities to exploit the sensory cues emitted by maternal females. Once in physical contact with the mother, the targets of neonatal sensory and behavioural skills are the nipples (Schaal 2010). But great taxonomic differences in neonatal sensory and motor abilities are associated with different levels of offspring development at birth. Here, the discussion will be restricted to two representatives of the order *Rodentia*, family *Muridae*, sub-family *Murinae*, namely the domestic forms of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus*. The rat and the mouse have in common that their pups are born altricial, in the sense that they have limited locomotor and thermoregulatory abilities (Rosenblatt 1983; Blass et al. 1977; Bouslama et al. 2005). Accordingly, the pups of both species are raised in a nest where they are in quasi-permanent contact with their mother, and, in the case of mice where communal nursing is frequent, with other females (König and Markl 1987; Schultz and Lore 1993). Another correlate of neonatal altriciality is that the pups' sensorium is only partially functional at birth. Somesthesia and chemoreception are then already functional (although still maturing), audition comes into play only by postnatal day 9, and vision by days 14-15, in both the rat (Suckow et al. 2006) and the mouse (Ehret 1976; Weber and Olsson 2008). Neonate pups can thus only be guided to the mother's nipple by tactile, thermal and chemical cues. Although the contribution of somesthesia is admittedly considerable (e.g., Rosenblatt 1983), the emphasis will be here on olfaction which appears crucial in arousing, motivating and guiding the initial behaviour of neonates (Blass and Teicher 1980), and remains dominant in controlling behaviour during later development up to weaning (Breen and Leshner 1977; Hennessy et al. 1980).

The mouse and the rat may differ in the chemosensory systems that direct their behaviour. In both species, the main olfactory system is operative in the foetus several days before birth (Coppola and Millar 1997; Pedersen and Blass 1982; Smotherman and Robinson 1987), so that olfaction is in a good position to participate in the development of sensory processes and preferences. But rats and mice differ in the range of chemosensory subsystems governing neonatal behaviour. While the vomeronasal system functions in the rat foetus from the last days of gestation (Pedersen et al. 1983), it does not appear to do so before birth in mice (Coppola and O'Connell 1989; Coppola et al. 1993).

Nipple search and suckling in newborn animals is powerfully triggered, directed and regulated by olfactory cues. In this context, stimulus-response associations are determined by two types of mechanisms. First are mechanisms that apparently do not depend on postnatal experience for their

development; these mechanisms rely on stimuli (signals) eliciting responses which morphology is quasi-complete at very first expression, *i.e.* apparently without need of prior direct exposure and training. Second are stimuli that are clearly experience-dependent, *viz.* involving direct exposure to give rise to an efficient response. These experiential processes can operate during gestation (e.g., Pedersen and Blass 1982; Smotherman 1982a, b; Todrank et al. 2011), during the natal process (Ronca et al. 1994), or, more obviously, postnatally in direct contact with the mother's body and mammae, which form an extremely potent context for the rapid learning of contingent odour cues (Alberts 1987).

Although the suckling interaction has been studied in many mammalian taxa from the ethological and ecological points of view, their chemical and chemosensory underpinnings remain unclear and still little investigated. This area of research has attracted a considerable surge of work in the 1970' and 1980' (reviewed, for example, in Rosenblatt 1983; Blass 1990), but conclusive results are still needed in many ways. Based on previous results and several reviews of them (Blass and Teicher 1980; Blass 1990; Raineke et al. 2010; Schaal et al. 2009; Schaal 2010), and based on our own recent work on the mouse, we intent here comparing the odour cues that likely guide rat and mouse newborns to the nipple and initiate suckling. From the outset, it may be posited that any comparison will be imperfect as rat and mouse pups have not been tested in exactly the same conditions with the same paradigms. However, homologous compounds or biological substrates (amniotic fluid, milk, maternal and pup salivas) have often been used in a functionally similar context (nipple searching/seizing) at similar developmental stages (*i.e.*, in more or less nursing-experienced newborn pups). Accordingly, some comparative inferences and prospective studies may be proposed.

6.2 Lactating Females are Uniquely Salient for Newborn Pups

Neonatal rats and mice are strongly aroused by the odour emitted by the whole body of conspecific lactating females when presented against the odour from non-lactating females. When put in contact with the abdomen of an anaesthetised conspecific lactating female, they express searching and oral grasping of a nipple (Hofer et al. 1976; Belin et al. 2011; Al Aïn et al. 2012b). Lactation correlates thus clearly with the release of attractive cues in both species (Galef and Muskus 1979; Al Aïn et al. 2012a). The basic role of olfaction in suckling behaviour is attested through its perturbations either after genetic defection of the olfactory system (Hongo et al. 2000), by hampering olfactory abilities [lesion of olfactory bulbs (e.g., Kovach and Kling 1967); peripheral denervation (e.g., Hofer et al. 1976)], or by altering local stimuli by washing the source of emission with organic solvents (Hofer et al. 1976; Teicher and Blass 1976) or water (Hongo et al. 2000).

Thus, nipple-related odour cues are detectable to mouse and rat pups, and can be suppressed by mere washing. Although the precise bodily source(s) and nature of substrates involved are poorly understood, it is now clear that nipples of lactating females may constitute olfactory hotspots that attract inexperienced neonates and facilitate their suckling performance. The term “hotspot” is used here in all senses, as warmer skin regions overlaying mammary structures (Hofer et al. 1976) and affording at the same time thermal cues and thermally-enhanced odour cues to newborn pups.

6.3 Prenatal Odour Cues in Initial Suckling

Right after being born, rat pups are endowed with a range of extra-mammary substrates brought to the nipple by the periparturient female's self-licking. These include blood, amniotic fluid (AF) and maternal saliva (see following section). AF was shown to elicit oral grasping of a nipple that has been painted with it (Teicher and Blass 1977). Rat pups on postnatal day (PND) 1 also display sustained crawling toward AF odour, but not toward an unfamiliar artificial odorant (Méndez-Gallardo and Robinson 2011). In *Balb-C* mice, nursing-inexperienced 5-8 h-old pups also initiated suckling when placed close to a nipple of a non-lactating female painted with AF taken from another conspecific female (Belin et al. 2011). The potency of AF odour was also noted in two day-old mice who preferred suckling a nipple coated with it, whereas saline and vanilla (as a novel odour) revealed ineffective (Kodama 1990).

The potency of AF to trigger appetitive behaviour in newly born rodents can be explained by some reinforcing value presumably assigned to it *in utero*. The reinforcing value of this odour experienced in aqueous conditions of reception is then well conserved in aerial conditions. But two volatile fractions of AF compounds may be considered: the one that is species-specific – common to all members of the species – and the one that is individual-specific – proper to each mother-foetus system. The above

experiments in rats and mice used AF collected in females other than the mother, thus taping into the supra-individual fraction (at least within a given colony) of the AF odour. Individual-specific amniotic odorants may also govern pup behaviour, and it is through their systematic investigation that foetal olfactory learning was demonstrated in mammals. Prenatal odour learning was established in the rat concurrently by Pedersen and Blass (1982) and by Smotherman (1982a,b). These experimenters injected an artificial odorant into the amniotic sacs on embryonic day 19 or 20, and by testing newborn pups thereafter they showed an increased attraction to the target odorant. Hepper (1987) later demonstrated the ability of foetal rats to encode the individual characteristics of their own AF odour without addition of any extraneous odorant and suggested its involvement in kin recognition processes. At parturition, rat and mouse females have their nipples endowed with cues from the amniotic environment that trigger activation, orientation and oral grasping in their newly born offspring. Accordingly, rat and mouse newborns are initially exposed to, and attracted by, the odour of the AF, even when it is not the neonate's own fluid (reviewed in Robinson and Méndez-Gallardo 2010); thus, the neonates' positive response to AF might be traced into some colony- or species-specific odor experience *in utero*.

6.4 Postnatal Odour Cues in Initial Suckling

But AF is not the only releaser of initial nipple grasping response in newly born rat and mouse pups. Saliva from post-parturient females, but not from virgin females, was also shown to elicit nipple grasping in suckling-inexperienced rat pups (Teicher and Blass 1977). Olfactory correlates of lactation are thus also expressed in some extra-mammary sources.

The saliva-related responses of the mouse pup appear different from that of the rat pup, however. When placed at the nipple of a non-lactating female that was treated with saliva collected from a parturient dam, nursing-inexperienced mouse pups did *not* react by immediate grasping (Al Aïn et al. 2012b).

Thus, when examining the initial reactions of rat and mouse newborns to the saliva of lactating conspecifics, findings seem at variance in both species. Maternal saliva appeared indeed potent in neonatal rats (Teicher and Blass, 1977), but not in neonatal mice (Belin et al. 2011). Whether this reflects a species difference in maternal saliva composition or differential disponibility of it on nipples is unknown. The maternal behaviour of rats and mice during and after parturition is indeed characterised by intense self- and pup licking (Hood et al., 2003; Weber and Olsson, 2008). With advancing labour, between each delivery, females of both species alternate self- and pup licking, suggesting that maternal saliva is abundantly distributed over the ventral fur/nipples while pups are vigorously aroused by licking while they nose over the nipples. Thus, variation in direct exposure to maternal saliva odour may not explain the seeming species difference in the salience of saliva to elicit initial nipple grasping.

Regarding milk, the rat-mouse comparison is not possible as, surprisingly enough, it seems that no study has assessed the behavioural activity of conspecific milk in newly born rat pups. To the best of our knowledge, only one study has tested conspecific milk in rat pups, but these were aged PND 7-8. At this age, rat milk was ineffective in releasing the nipple grasping in rat pups (Singh and Hofer 1978). However, the potential implication of conspecific milk in the elicitation of nipple grasping was clearly demonstrated in newborn mice. Painting fresh mouse milk on the nipples of an anaesthetised non-lactating mouse had a strong positive effect on oral grasping in mouse pups (as compared with nipples of painted with water) (Belin et al. 2011; Al Aïn et al. 2012b).

The behavioural activity of fresh milk on neonatal mice before any postnatal exposure may derive from prenatal learning. Neonate mice pups might thus encounter in milk a fraction of the compounds already met in AF, following the general process of transnatal chemosensory continuity noted in most mammals studied so far (reviewed in Schaal 2005), including the rat (e.g., Hepper 1987; Arias and Chotro 2006). However, whether newborn rats respond to rat milk is an open area for future research, as they have paradoxically been tested only with bovine milk (which is attractive for them; e.g., Méndez-Gallardo and Robinson 2011).

Maternal saliva and milk are, in part, transudates from maternal blood plasma, and as such may compositionally overlap with AF (Schaal 2005), facilitating the early learning of the odours they convey. But these different substrates may also just be present on the nipple at the very first suckling episode and become rapidly associated with suckling.

6.5 The Cueing Value of Nipple-Related Odour Substrates Changes as a Function of Nursing Experience

In the newborn mouse, the response to saliva changes over time and necessitates direct exposure before it emerges. The saliva of a lactating female begins to release nipple grasping in mice 6 to 8 h after birth (i.e., after about 1 to 4 h of suckling experience; Belin et al. 2011; Al Aïn et al. 2012b). After more extensive suckling experience during the first 24 h, pup saliva becomes effective in mice on PND 1 (Belin et al. 2011), as well as in rat pups on PND 2 and older (Blass and Teicher 1980). Accordingly, the cueing value of maternal saliva (in mouse pups) and of pup saliva (in mouse and rat pups) to promote nipple grasping depends on the amount of direct exposure to saliva odour in the context of suckling. But, in the mouse at least, current evidence indicates that pup saliva requires more suckling experience than maternal saliva to become behaviourally significant.

Thus, the cuing value of milk (see previous section) and of pup and maternal saliva appear to be shaped through learning. At PND 5-6, in mouse pups, all odour substrates presumed to be present on the nipples were separately as potent to elicit approach response as the whole nipple odour of lactating mice, and they were all equally attractive when paired (Al Aïn et al. 2012a). This suggests that all of these substrates may convey common compounds. It is indeed probable that maternal milk and saliva share volatiles derived from food or general metabolism (e.g., Galef and Henderson 1972; Bronstein et al. 1975). In the same way, suckling pups may impregnate nipples with their own saliva, as well as with a mixture of saliva and milk coagulate. Otherwise, all of these odour substrates may have got similar reinforcing value because they were encoded in contingency with the same rewarding endpoints, viz., comfort contact, warmth, and the mere action of sucking. Sucking-related odour learning is indeed a general phenomenon in mammalian perinates (e.g., Alberts 1987; Rosenblatt 1983; Schaal 2005), and it can result in an equivalent reinforcing value of functionally different odour cues. This interpretation is strengthened by the fact that the dorsal odour from lactating females, not associated with nursing, is less attractive to mouse pups than the ventral odour (Al Aïn et al. 2012a). Hence, being exposed for most of their interactions with the mother to the blend formed by mammary (milk) and extra-mammary odours (AF, salivas), mouse pups exhibit undifferentiated attraction to all these substrates presented separately. In addition, besides sucking-induced odour preference, newborn mice also develop a preference for odorants linked with aspects of maternal care that are specially arousing, such as ano-genital licking or its experimental simulation with a soft paint-brush (Durand et al. 2003; Bouslama et al. 2005; Armstrong et al. 2006).

Finally, maternal urine presumably spread on nipples during the avid licking of their own and their pups' ano-genital areas, is also susceptible to create salient cues for pups. Nevertheless we have clearly observed in mice that maternal urine is not involved in the grasping-sucking response at birth and later (Belin et al. 2011; Al Aïn et al. 2012b), although it is later profoundly engaged in social relations (e.g., Hurst 1990).

6.6 Predisposed Mechanisms Implied in Suckling?

The above results explained the suckling response of rat and mouse neonates to odour substrates on the nipple through learning mechanisms. Nevertheless, some stimuli might initiate oral grasping before any previous exposure. In that line, Pedersen and Blass (1981) have tested rat pups' responsiveness to dimethyldisulfide (DMDS), a compound that was targeted by extrapolation if its involvement in the sexual attraction of male hamsters to the female. DMDS was indeed traced in the saliva of rat pups, and shown to be effective in nipple grasping of 3-5 day-old pups, but with a much lower potency than nipples of lactating rats. Nonetheless as the rat pups were already aged PND 3-5, they could have acquired DMDS odour as a cue because of its regular association with suckling. Nevertheless, DMDS appears singular because it has the power to elicit oral and general responsiveness already in the foetus, where it mimics the response to bovine milk (Smotherman and Robinson 1992). DMDS is reported not to be chromatographically (GC) traceable in AF (Blass 1990), leading to the logical conclusion that its behavioural salience might not depend on prenatal exposure. Overall, however, before DMDS can be conclusively defined as an unconditional stimulus triggering oral grasping in the rat newborn, its effect should be tested at the very first postnatal exposure.

Compounds emitted in the mammary tract (either in milk or in nipple-skin secretions) carrying similar effects have not been evidenced so far in the rat or in the mouse. Nevertheless, it cannot be excluded that mouse pups' initial response to conspecific milk could derive from an unconditional release of

searching-grasping responses, in a way comparable to the rabbit mammary pheromone (Schaal et al. 2003, 2009). But this needs more investigation.

6.7 Conclusion

Studies on neonatal behaviour in the rat and the mouse have shown similarities, but also apparent species-specificities, in the elicitation and regulation of nipple searching and grasping. Right at birth, neonate pups appear to rely on cues already encountered prenatally, AF, and that females spread on their ventrum and nipples in the course of their normal maternal behaviour. Rat and mouse pups are thus exposed to an already familiar odour substrate while rooting for, seizing and sucking, a nipple for the first time. But, in addition, other substrates are present due to the normal physiology and behaviour of the dam, such as secretions from nipple glands, milk, maternal saliva, or pup saliva. All these compounds, at least when they are presented separately, do not seem to bear the same cueing value for neonatal rats and mice. While rat pups are attracted to saliva right from birth, mouse pups are not. Whether this disparity in neonatal dispositions reflects a species difference needs to be ascertained, as it will direct the search for chemicals that govern the vital responses of nursing-inexperienced rat and mouse pups towards nipples and milk.

References

- Al Aïn S., Chraïti A., Schaal B. and Patris B. (2012a) Orientation of newborn mice to lactating females: Biological substrates of semiochemical interest. *Dev. Psychobiol.* doi: 10.1002/dev.21003
- Al Aïn S., Belin L., Schaal B., Patris B. (2012b) How a newly born mouse gets to the nipple? Odor substrates eliciting first nipple grasping and sucking responses. *Dev. Psychobiol.*
- Alberts, J.R. (1987) Early learning and ontogenetic adaptation. In: N.A. Krasnegor, E.M. Blass, M.A. Hofer, W.P. Smotherman (Eds.), *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Orlando, FA: Academic Press, pp. 12-38.
- Arias C. and Chotro, M.G. (2006) Interactions between prenatal ethanol exposure and postnatal learning about ethanol in rat pups. *Alcohol* 40, 51–59.
- Armstrong, C.M., DeVito, L.M., and Cleland, T.A. (2006) One-Trial Associative Odor Learning in Neonatal Mice. *Chem. Senses*, 31, 343-349.
- Belin, L., Al Aïn, S., Schaal, B. and Patris, B. (2011) Which odor substrates induce nipple grasping at birth in newborn mice? *Dev. Psychobiol.* 53, 741.
- Blass, E.M, Teicher, M.H., Cramer, C.P., Bruno, J.P. and Hall, W.G. (1977) Olfactory, thermal, and tactile controls of suckling in preauditory and previsual rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 9, 1248-1260.
- Blass, E.M. (1990). Suckling: Determinants, changes, mechanisms, and lasting impressions. *Dev. Psychol.* 26, 520-533.
- Blass, E.M., and Teicher, M.H. (1980) Suckling. *Science* 210, 15-22.
- Bouslama, M., Durand, E., Chauvière, L., Van den Bergh, O. and Gallego, J. (2005). Olfactory classical conditioning in newborn mice. *Behav. Brain Res.* 161, 102-106.
- Breen, M.F., and Leshner, A.I. (1977) Maternal pheromone: a demonstration of its existence in the mouse (*Mus musculus*). *Physiol. Behav.* 18, 527-529.
- Bronstein, P.M., Levine, M.J., and Marcus, M. (1975) A rat's first bite: the non-genetic, cross-generational transfer of information. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 89, 295-298.
- Coppola, D.M., and Millar, L.C. (1997) Olfaction in utero: Behavioural studies of the mouse fetus. *Behav. Processes* 39, 53-68.
- Coppola, D.M., and O'Connell, R.J. (1989) Stimulus access to olfactory vomeronasal receptors in utero. *Neurosci. Lett.* 106, 241-248.
- Coppola, D.M., Budde, J., and Millar, L. (1993) The Vomeronasal duct has a protracted postnatal development in the mouse. *J. Morphol.* 218, 59-64.
- Durand, E., Dager, S., Vardon, G., Gressens, P., Gaultier, C., De Schonen, S., et al. (2003) Classical conditioning of breathing pattern after two acquisition trials in 2-day-old mice. *J. Appl. Physiol.* 94, 812-818.
- Ehret, G. (1976). Development of absolute auditory thresholds in the house mouse (*Mus musculus*). *J. Am. Audiol. Soc.* 1, 179-184.
- Galef, B.G. and Henderson, P.W. (1972) Mother's milk: a determinant of the feeding preferences of weaning rat pups. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 78, 213-219.
- Galef, B.G., and Muskus, P.A. (1979) Olfactory mediation of mother-young contact in Long-Evans rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93, 708-716.
- Hennessy, M.B., Li, J. and Levine, S. (1980) Infant responsiveness to maternal cues in mice of 2 inbred lines. *Dev. Psychobiol.* 13, 77-84.
- Hepper, P.G. (1987) The amniotic fluid: An important priming role in kin recognition. *Anim. Behav.* 35, 1343-1346.
- Hofer, M.A., Shair, H. and Singh, P. (1976) Evidence that maternal ventral skin substances promote suckling in infant rats. *Physiol. Behav.* 17, 131-136.
- Hongo, T., Hakuba, A., Shiota, K. and Naruse, I. (2000) Suckling dysfunction caused by defects in the olfactory system in genetic arhinencephaly mice. *Biol. Neonate* 78, 293-299.

- Hood, K.E., Dreschel, N.A. and Douglas A. (2003) Maternal behavior changes after immune challenge of neonates with developmental effects on adult social behavior. *Dev. Psychobiol.* 42, 17-34.
- Hurst, J.L. (1990) Urine marking in populations of wild house mice *Mus domesticus* Ratty. III Communication between the sexes. *Anim. Behav.* 40, 233-243.
- Kodama, N. (1990) Preference for amniotic fluid in newborn mice. Annual Meeting of the International Society for Developmental Psychobiology, Cambridge, UK.
- König, B. and Markl, H. (1987) Maternal care in house mice. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 20, 1-9.
- Kovach, J.K. and Kling, A. (1967) Mechanisms of neonate sucking behaviour in the kitten. *Anim. Behav.* 15, 91-101.
- Méndez-Gallardo, V. and Robinson, R.R. (2011) Amniotic fluid and milk odor evoke crawling locomotion in the newborn rat. *Dev. Psychobiol.* 53, 757.
- Pedersen, P.A., and Blass, E.M. (1981) Olfactory control over suckling in albino rats. In: R. N. Aslin, R. Alberts, and M. R. Petersen (Eds.), *Development of perception, Psychobiological perspectives*, Vol. 1. Audition Somatic Perception and the Chemical Senses. Academic Press, New-York, pp. 359-381.
- Pedersen, P.A. and Blass, E.M. (1982) Prenatal and postnatal determinants of the 1st suckling episode in albino rats. *Dev. Psychobiol.* 15, 349-355.
- Pedersen P.E., Stewart, W.B., Greer C.A. and Shepherd G.M. (1983) Evidence for olfactory function in utero. *Science* 221,478-480.
- Raineki, C., Pickenhagen, A., Roth, T.L., Babstock, D.M., McLean, J.H., Harley, C.W., Lucion, A.B. and Sullivan, R.M. (2010) The neurobiology of infant maternal odor learning. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 914-919.
- Robinson, S.R., and Méndez-Gallardo, V. (2010) Amniotic fluid as an extended milieu intérieur. In: K.E. Hood, C.T. Halpern, G. Greenberg, and R.M. Lerner (Eds.), *Handbook of developmental science, behaviour, and genetics*. Blackwell, New York, pp. 234-284.
- Ronca, A.E., Kamm, K., Thelen, E. and Alberts, J.R. (1994) Proximal control of fetal rat behavior. *Dev. Psychobiol.* 27, 23-38.
- Rosenblatt, J.S. (1983) Olfaction mediates developmental transitions in the altricial newborn of selected species of mammals. *Dev. Psychobiol.* 16(5), 347-375.
- Schaal, B. (2005) From amnion to colostrum to milk: bridging in early developmental transitions. In: B. Hopkins, S. Johnson (Eds.), *Prenatal development of postnatal functions*. Westport, CT: Praeger, pp. 52-102.
- Schaal, B. (2010) Mammary Odor Cues and Pheromones: Mammalian Infant-Directed Communication about Maternal State, Mammary, and Milk. *Vitam. Horm.* 83, 83-136.
- Schaal, B., Coureaud, G., Doucet, S., Delaunay-El Allam, M., Moncomble, A.S., Montigny, D., et al. (2009) Mammary olfactory signalisation in females and odor processing in neonates: ways evolved by rabbits and humans. *Behav. Brain Res.* 200(2), 346-358.
- Schaal, B., Coureaud, G., Langlois, D., Ginies, C., Sémon, E. and Perrier, G. (2003) The mammary pheromone of the rabbit: chemical and behavioural characterisation. *Nature* 424, 68-72.
- Schultz, L.A. and Lore R.K. (1993) Communal reproductive success in rats (*Rattus norvegicus*) - effects of group composition and prior social experience. *J. Comp. Psychol.* 107, 116-122.
- Singh, P.J., & Hofer, M.A. (1978) Oxytocin reinstates maternal olfactory cues for nipple orientation and attachment in rat pups. *Physiol. Behav.* 20(4), 385-389.
- Smotherman, W.P. (1982a) Odor aversion learning by the rat fetus. *Physiol. Behav.* 29, 769-771.
- Smotherman, W.P. (1982b) In utero chemosensory experience alters taste preferences and corticosterone responsiveness. *Behav. Neural Biol.* 36, 61-68.
- Smotherman, W.P. and Robinson, S.R. (1987) Psychobiology of fetal experience in the rat. In: N. A. Krasnegor, E.M. Blass, M.A. Hofer and W.P. Smotherman (Eds.), *Prenatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic press, Orlando, FL, pp 39-60.
- Smotherman, W.P. and Robinson, S.R. (1992) Dimethyl disulfide mimics the effects of milk on fetal behavior and responsiveness to cutaneous stimuli. *Physiol. Behav.* 52(4), 761-765.
- Suckow, M.A., Weisbroth, S.H. and Franklin C.L. (2006) *The Laboratory Rat* (2nd ed.), Elsevier-Academic Press, San Diego, CA.
- Teicher, M.H., and Blass, E.M. (1976) Suckling in newborn rats: eliminated by nipple lavage, reinstated by pup saliva. *Science* 193, 422-425.
- Teicher, M.H., and Blass, E.M. (1977) First suckling response of the newborn albino rat: the roles of olfaction and amniotic fluid. *Science* 198, 635-636.
- Todrank, J., Heth, G. and Restrepo, D. (2011) Effects of in utero odorant exposure on neuroanatomical development of the olfactory bulb and odour preferences. *Proc. Soc. Lond. B.* 278, 1949-1955.
- Weber, E.M., and Olsson, I. A.S. (2008) Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: An ethological review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 114, 1-22.

2) Poster – XXth International Congress on the European Chemoreception Research Organisation. Avignon, France (14-19 sept. 2010).



Psychobiological effects of perinatal exposure to odorants in mice. Part II: Behavioural alteration



Marije Oostindjer¹, Syrina Al Ain², Bruno Patris², Hervé Cadiou², Xavier Grosmaître², Benoist Schaal²

1. Adaptation Physiology Group, Wageningen University, The Netherlands. marije.oostindjer@wur.nl

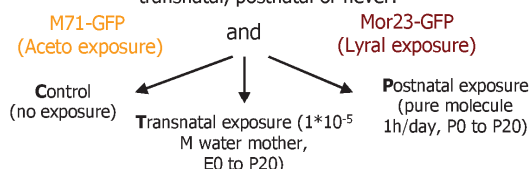
2. Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR 6265 CNRS-Université de Bourgogne-Inra, Dijon, France. bpatris@u-bourgogne.fr

Aim

Test effects of trans- and postnatal exposure to lyral and acetophenone on preference and olfactory sensitivity to gain more insight in the role of olfactory epithelium in flavour learning. If the olfactory epithelium is involved, preference and sensitivity were expected to be lower in lyral-exposed animals and unchanged in acetophenone-exposed animals (see Part I).

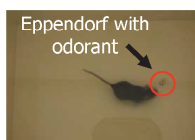
1. Exposure procedure

M71-GFP and Mor23-GFP mice (green-fluorescent-protein labeled olfactory receptors M71 (acetophenone) and Mor23 (lyral)) were exposed to aceto or lyral respectively, either transnatal, postnatal or never:

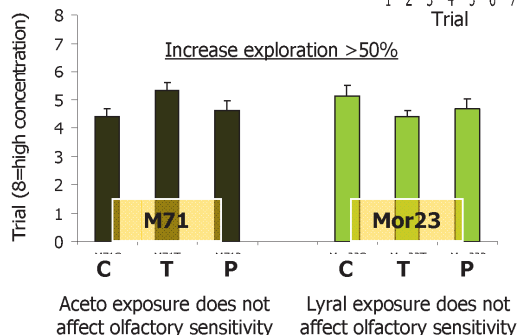
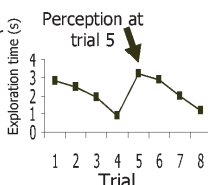


2. Sensitivity test

Habituation-dishabituation paradigm: Mouse habituated to device with two water trials. Then odorant in low concentration (aceto: 9.54×10^{-7} M, lyral 9.77×10^{-9} M). Six odor trials, increase concentration (aceto 1.6x, lyral 4x) to 1×10^{-5} M.



Assumption: High exploration in water trials, then decrease when mouse is habituated. Increase in exploration >50%: perception of odor (novelty in test) in that trial: olfactory sensitivity for that odor.

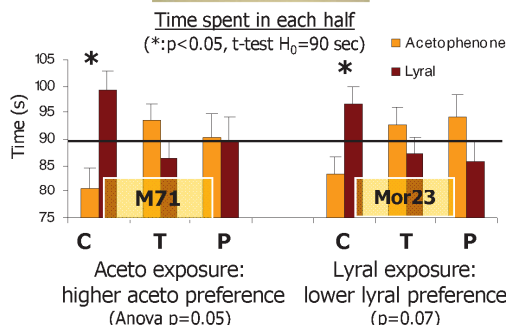
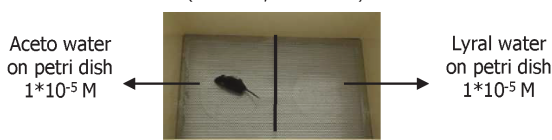


Conclusions

Perinatal exposure to aceto increased preference while lyral exposure decreased preference. Perinatal exposure did not affect olfactory sensitivity in either strain. No direct link between behaviour and receptor density (Part I), suggesting that preference and receptor changes are two independent effects of perinatal flavour exposure.

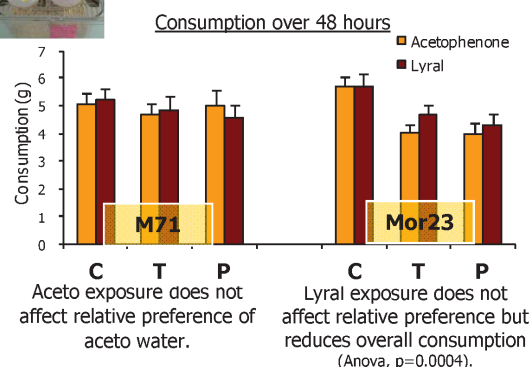
3. Exploration test

Mice exposed to device on P20 for 3 min (M71 n≥18, Mor23 n≥19)



4. Two-bottle consumption test

Aceto and Lyr 1×10^{-5} M odourized water in home cage for 48 hours (P21-P23). (M71 n≥19, Mor23 n≥18)



XXth ECRO Congress, Avignon, France, septembre 2010

