HAL open science

Réponses de peur et encodage du temps dans la formation des mémoires de peur chez le rat : du comportement aux réseaux neuronaux

Maryne Dupin

▶ **To cite this version:**

Maryne Dupin. Réponses de peur et encodage du temps dans la formation des mémoires de peur chez le rat : du comportement aux réseaux neuronaux. Neurosciences. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1308 . tel-02520473v2

HAL Id: tel-02520473

https://theses.hal.science/tel-02520473v2

Submitted on 31 Mar 2020

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.

N° d'ordre NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale ED476
Neurosciences et Cognition

Soutenue publiquement le 17/12/2019, par :

Maryne DUPIN

Réponses de peur et encodage du temps dans la formation des mémoires de peur chez le rat :
du comportement aux réseaux neuronaux

Devant le jury composé de :

Dr Guillaume FERREIRA	(Directeur de recherche)	Rapporteur
Pr Mouna MAROUN	(Professeure des universités)	Rapporteure
Dr Karim BENCHENANE	(Chargé de recherche)	Examinateur
Pr Karyn JULLIARD	(Professeure des universités)	Examinatrice
Dr Anne-Marie MOULY	(Chargée de recherche)	Directrice de thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Merci !

Bien qu'apparaissant au début d'un manuscrit, les remerciements sont en quelque sorte la conclusion de toute une thèse. J'aime l'idée que l'on ne se fait pas tout seul, que l'on doit forcément quelque chose aux autres. Nos principaux choix, chemins et victoires sont très rarement le fruit de notre seule volonté et de nos seules compétences.
Je ne serais surement pas en train d'écrire ces lignes sans un certain nombre de personnes qui ont non seulement permis l'aboutissement de ce travail, mais qui m'ont également permis de m'enrichir humainement. Les mots me paraissent bien faibles pour exprimer l'entièreté de la gratitude que je ressens pour toutes ces personnes, mais je vais essayer de la plus juste des manières de coucher sur le papier ses sentiments si précieux à mes yeux.

Tout d'abord, je remercie le Dr. Maroun et le Dr. Ferreira d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, même si cela s'est décidé à la dernière minute pour l'un d'entre eux…

Je remercie ensuite le Dr. Benchenane d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse, ainsi que le Pr. Julliard qui a également endossé le rôle de présidente du jury.

Je remercie enfin le Pr. Rémi Gervais d'avoir volé à notre secours en acceptant de faire partie du jury seulement quelques jours avant la soutenance. Mais ce n'est pas la seule chose dont j'ai envie de te remercier car tu as endossé bien d'autres casquettes. Tu m'as aidé lors de la préparation du concours de bourse de thèse il y a presque 4 ans de cela, tu as toujours manifesté ton intérêt et ton enthousiasme pour mes travaux, tu m'as également beaucoup aidé à préparer ma soutenance, à structurer l'article… Tes conseils ont toujours été d'une pertinence déconcertante, tu as su nous relever la tête du guidon quand il le fallait, tout paraissait alors si simple et logique après une réunion avec toi. Merci pour cela.

Un grand merci général à l'ensemble du jury pour m'avoir offert une belle soutenance, avec des discussions et des échanges riches. Merci pour leur patience lors des bugs informatiques indépendants de ma volonté et pour leur déplacement (réussi ou non) pas si facile que cela en période de grève.

Je remercie Christelle Peyron et Valérie Doyère d'avoir accepté d'être membre de mon Comité de Suivi de Thèse et d'avoir apporté leurs précieux conseils et expertise sur mon travail.

Merci à toi, Anne-Marie, ma chère directrice de thèse. Je suis à tes côtés depuis le stage de Master 1. Quand je suis sortie de l'entretien pour ce stage, je me rappelle que l'aspect scientifique m'enthousiasmait toujours autant que sur le papier, mais je me rappelle surtout ce que j'ai ressenti humainement. J'ai tout de suite aperçu la gentillesse, la douceur et la bienveillance qu'il y a en toi. Je me sentais en confiance. Tu es faite pour encadrer des étudiant(e)s, pour partager, transmettre tes connaissances et tes compétences. Jamais je n'aurais pu rêver meilleure tutrice de stage et c'est d'ailleurs pour cela que je n'ai plus quitté le navire et que l'on a pagayé ensemble pendant encore un long moment pour en arriver ici aujourd'hui. Merci d'avoir cru en moi pour cette thèse. Tu m'as accepté dès le début avec ma timidité et ma réserve et tu as su petit à petit (même si le chemin est encore long) me faire prendre confiance en moi. J'ai pu découvrir en toi une personne passionnée par ce qu'elle fait, ce qui rend si agréable et facile le travail avec toi. J'ai adoré que l'on apprenne ensemble

l'électrophysiologie même si cela n'a pas toujours été facile … (Je déteste toujours autant le 50Hz). Merci pour tous les congrès que l'on a fait ensemble, tu m'as permis d'aller présenter mes travaux dès que l'occasion se présentait et d'assister à des conférences passionnantes… c'est une chance incroyable ! Tu m'as aussi permis de devenir une experte sur Excel, au grand dam de Sam… Les situations et souvenirs que j'ai en tête sont bien trop nombreux pour que je les cite tous, mais ils m'amènent tous à te dire une seule chose : merci. Merci pour la personne que tu es et merci pour le cocon que tu as tissé pour que je puisse réaliser ma thèse dans les meilleures conditions. Tu vas beaucoup me manquer ! J'espère de tout cœur que tu as pu clore ta longue liste d'étudiants en thèse d'une façon qui t'est agréable.
PS : Ce paragraphe n'est surement pas très bien structuré, mais je n'ai pas mis un seul « va » à l'intérieur, as-tu remarqué ?

Un énorme merci à tout le ~~placard à gâteau~~ bureau 108 puis 115, qui aurait cru au tout début que l'on se supporterait autant de temps et que je serais si triste de vous quitter ? :p

Merci à toi Anne, pour les « râlages », notre amour commun des plantes, les discussions profondes et moins profondes, les thés partagés ensemble, ton comique de répétition (« Hey les gars, j'ai perdu ma carte bancaire ! » Enfin, parfois tu innovais, c'était les clés) ... Merci aussi pour les supers moments que l'on a passé ensemble en congrès, je suis vraiment heureuse de les avoir partagés avec toi (on se remémorera encore longtemps de nos petits déjeuners-pastèque à 19 euros, ou encore des plages de Porquerolles, des conférences plénières du dimanche matin, ...). La légende raconte aussi que l'on se souviendra surtout de ton vélo rose.

Merci Baptiste pour avoir été l'Homme derrière les blettes, pour ton énergie foudroyante, les réserves de graines de pavot et aussi de quignons de pain, le UK (Ubber Kebab), les jeux vidéo (t'as envoyé la fusée sur Factorio j'espère ? Et entraine-toi sur Apex, je t'y attends). La légende raconte aussi que l'on se souviendra surtout de ta barbe et de tes tasses à cafés.

Merci Maxime pour ta politesse, ta courtoisie et ton humour quasiment (mais pas trop) au niveau du mien. Ta motivation à aller à la piscine le midi est une vraie source d'inspiration ! Merci aussi pour les cookies (tu peux me donner ta recette ??), les références en idioties souvent copiées sur les miennes, tes idées d'expériences incongrues (comme celle avec le compresseur d'air). Merci d'avoir apporté le pouf orange (tu le vois de quelle couleur toi d'ailleurs ?). La légende raconte aussi que l'on se souviendra surtout de ton enthousiasme fou lors du déménagement et des postures ergonomiques à ton poste de « travail ».

Merci à toi Lucile, le dernier petit Lu' du paquet à nous avoir rejoint dans le bureau, merci pour les petits mots collés partout et qui réchauffent le cœur, les petites attentions (comme le petit cheval de Dalécarlie), les vidéos fb, les potins qui arrivaient toujours à tes oreilles en premier… Merci aussi pour ta curiosité et tes questions yoga/sport, d'avoir rejoint le club thé/tisane avec Anne et moi. La légende raconte aussi que l'on se souviendra surtout de tes baskets de sports disposées à différents endroits du bureau et de ton pneu de vélo dégonflé.

Ces remerciements sont à l'image de notre bureau, sur le ton de l'humour, mais ils n'en sont pas moins sincères. Merci à vous 4 pour votre incroyable gentillesse, les fous rires qui m'ont bien aidé tout au long de cette thèse, les repas le midi (avec ou sans kebab) et pour avoir été les personnes formidables que vous êtes, ne changez surtout pas ! Une fois j'ai lu une citation qui m'a fait penser à notre bureau : « Le rire est une poussière de joie qui fait éternuer le cœur ». Et bien je peux dire que j'ai été drôlement allergique durant ces 3 années !

Merci aussi à Nadia et Inès, qui ont eu la malchance de ne pas partager notre bureau mais qui n'ont pas hésité à venir chercher un peu de bonne humeur (et de gâteau, ou de rôti

pour Nadia) dans notre antre ! Merci d'ailleurs à vous deux de nous avoir soustrait Baptiste du bureau pendant ma rédaction, il était beaucoup trop bruyant.

Quelques autres étudiants sont aussi passés par là au cours de ces trois années, et qui ont chacun pu apporter leur petite pierre (ou gros cailloux) à l'édifice.

Merci Jules pour les retours du labo à vélo avec les grandes discussions philosophiques et pour l'énorme aide pour mon pot de thèse (Merci d'ailleurs à Romain qui t'as aussi aidé et à Aurore qui a dû supporter l'alarme incendie !). Merci pour ta gentillesse et ton enthousiasme constant. Tu es brillant, tu feras un super futur doctorant et chercheur, c'est clairement fait pour toi.

Merci Maxime IIème du nom (n'enlevons pas le privilège de Maxime Ier) pour les discussions PAC et PEC (science et sport, le bon compromis) et pour les gâteaux petits dinosaures.

Merci Maximilien pour les gâteaux à la fois crus et brulés du midi, les discussions voyage et pour ton sourire.

Merci aussi à Dior et Lauren qui ont su apporter une touche de bonne humeur supplémentaire à notre quotidien.

Merci particulièrement à Jeanne et Philippine, mes deux petites stagiaires, pour ces quelques mois partagés avec vous sur un projet commun : ne pas casser les micropipettes de verre. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous tant pour les qualités professionnelles que humaines dont vous faites preuve.

Je tiens également à remercier mon équipe d'accueil, la CMO team, dans son ensemble. Il est difficile de décrire une équipe comme celle-ci tant elle est à part. CMO est un peu comme une grande famille. Un gout de reviens-y, peut-être dû aussi aux galettes CMO du mois de janvier ou aux brioches à la praline des réunions d'équipe. Mais je ne sais pas si c'est une si bonne chose finalement puisque l'on a du mal à s'en aller, et une fois que c'est fait, on aimerait vite revenir ! Vous allez tous tellement me manquer, tant scientifiquement qu'humainement.

Merci tout particulièrement à nos deux merveilleuses chefs d'équipe, Nadine et Nathalie qui arrivent à tout gérer de front en restant d'une jovialité et d'une gentillesse à toute épreuve. Une mention spéciale pour Nathalie (et son accent) qui a également été ma co-directrice de stage de Master 1 avec Anne Marie et qui a ouvert pour la première fois devant mes yeux un mainwindows avec des signaux électrophysiologiques dessus : du bêta, du thêta, de la respiration… Que du bonheur !

Merci Philippe pour tes anecdotes toujours rigolotes, Corine pour ta bienveillance (et aussi parce que tu portes le même prénom que ma maman), Emmanuelle pour la qualité de réflexion scientifique (tu m'as toujours impressionnée), Karyn pour ton rire, Nicolas pour tes talents en programmation, Jane pour ta force et ton calme, Alexandra pour tous les moments en congrès, … Merci également à Gérard, Barbara, Patricia et Tao avec qui j'ai eu moins l'occasion de passer du temps mais qui avaient toujours un mot gentil quand on se croisait dans les couloirs.

Merci également à l'ensemble de l'équipe technique et administrative.

Sam, je t'écrirais bien deux/trois lignes de code pour te remercier… mais ce serait en Matlab et tu ne comprendrais pas … et puis je n'ai pas le temps, j'ai des scripts à faire tourner ! Je me contenterais simplement de te dire merci. Tu es un génie en informatique. Merci pour toutes ses lignes de code (rémunérées ou non), pour toutes ses discussions analyse du signal,

pour tes compétences en programmation et pour avoir pris le temps de nous former un minimum à extraire des données sous Excel … Je pense que sans toi, il me resterait encore 4 ou 5 ans avant de finir ma thèse. D'ailleurs, tu as un créneau de disponible dans les semaines qui arrivent ? J'aurais des analyses de cohérence à faire sur mes data…

Merci Bel d'avoir partagé ton couloir avec moi, d'abord à Gerland puis au Neurocampus. Merci également pour les discussions marathon et course à pied, douleurs du piriforme et lombaire… Merci aussi (un petit peu) pour les rafistolages de poste de manip, les soudures inopinées, les tournevis égarés dans les salles de manip… et l'odeur de café dans les couloirs. Merci pour tes qualités humaines, tu aimes les gens et cela se ressent.

Merci Hervé pour tous les dépannages informatiques avec ou sans ticket, les discussions sur les ~~mots~~ phrases de passe, les astuces pour faire tomber les serveurs, …Merci aussi pour ta bonne humeur et toutes tes anecdotes de vie !

Merci Marc pour ta gentillesse et ta douceur, pour les dépannages Volcan, et aussi pour le vin : mon papa se régale grâce à toi !

Merci Ounsa pour ta gentillesse et pour t'être si bien occupée de mes petits rats.

Merci également à Brigitte, Romain et Florence qui nous enlèvent de grosses épines du pied (et même tout le cactus) en gérant la partie administrative qui nous donne tant de fil à retordre…

Merci aux « anciennes » personnes de CMO qui sont maintenant devenues grandes et ont réussi à quitter le nid : Lise B (reviens pour un subway !), Julie B, Alexandra G, Mickaël Z.

Même si toutes ces personnes sont comme une deuxième famille pour moi, je tiens à remercier du fond du cœur ma « vraie » famille.

Merci maman, merci papa. Le contexte professionnel formidable dans lequel j'ai évolué n'aurait pu exister sans vous. Vous m'avez permis d'en arriver là où je suis actuellement. Vous m'avez toujours encouragé dans les choix que j'ai pu faire et vous avez toujours fait en sorte que je puisse réaliser mes rêves. Merci de m'avoir donné le goût du dépassement de soi, la ténacité, et la force de faire « le sprint final ». Merci de m'avoir offert un endroit où je me sens bien et en sérénité et où il est toujours agréable de rentrer. Vous rendre fiers est la meilleure chose dont je puisse rêver. Merci d'être les parents que vous êtes, et merci pour tout ce que vous m'apportez, vous êtes formidables.

Merci Quentin, mon frère, un peu trop loin à mon goût. Vivement que l'on refasse des sorties vélo ensemble, cette fois je suis prête pour le col de l'Izoard.
PS : n'oublie pas que tu es un pisseur !

Merci Tatan. Tu n'es plus là pour pouvoir admirer le joli bout de papier que l'on m'a donné, mais je sais que tu aurais été fière et si contente !

Merci également à Gerald et Véronique, même si l'on ne se voit pas souvent, les moments passés ensemble sont toujours agréables.

Merci à Dany et René pour leurs petites pensées régulières.

Merci ma petite fifi, une vraie petite boule d'énergie, peut-être la seule à en avoir autant que moi !

Merci également à tous mes amis. Je ferais une mention spéciale pour Chrystel et Laurie, mes « sœurs de cœur ». Vous êtes là depuis la prépa, mais c'est comme si je vous connaissais depuis toujours. C'est un vrai bonheur de vous avoir à mes côtés et je mesure la chance que j'ai d'avoir des amies comme vous. Nos petites discussions m'ont toujours redonné le sourire et nos

week-end apéricube et campagnards sont une vraie bouffée de douceur ! D'ailleurs, il faut planifier le prochain week end… avant que tu sois maman Laurie !

Merci à mes amis de la salle de sport et mes coachs, qui ont du beaucoup entendre parler de thèse et de neurosciences durant les cours de cross, de WOD ou encore les trails en pleine tempête de neige !

Une dernière pensée pour tous mes petits rats durant ces trois années, ces animaux sont si intelligents et affectueux (capricieux même pour certains !) …

Merci à tous.

Abréviations

BLA	Amygdale Basolatérale
PFC, mPFC	Cortex préfrontal, cortex préfrontal médian
DMS	Striatum dorsomédian
PIR	Cortex piriforme postérieur
USV	UltraSonic Vocalizations
LFP	Potentiel de champ local (Local Field Potential)
SBF	Striatal Beat Frequency

Sommaire

Abréviations 5

Sommaire 9

Avant-propos et présentation de la thèse 15

Introduction générale 19

CHAPITRE 1 : Mémoire, émotions, mémoire émotionnelle 21

I. Qu'est-ce que la mémoire ? 23
1. Bref historique de la recherche sur la mémoire 23
2. La mémoire aujourd'hui : des systèmes de mémoire multiples 27

II. La mémoire émotionnelle 32
1. Les émotions 32
2. La peur 35
   a. Qu'est-ce que la peur ? 35
   b. Les réponses de défense 35
   c. Les manifestations physiologiques de la peur 38
3. Mémoire émotionnelle et conditionnement de peur 40

CHAPITRE 2 : Le conditionnement de peur à l'odeur 43

I. Du nez au cerveau : Perception et traitement du stimulus olfactif 45
1. Qu'est-ce qu'une odeur ? 46
2. L'épithélium olfactif principal 47
3. Le bulbe olfactif 48
4. Le cortex olfactif primaire 49
5. Projections vers le système limbique et les centres supérieurs 51

II. Neurobiologie du conditionnement de peur 52
1. Le conditionnement de peur au son 52
   a. Amygdale 52
   b. Hippocampe 55
   c. Cortex préfrontal médian 55
   d. Les cortex sensoriels 56
2. Le conditionnement de peur à l'odeur 57
   a. L'amygdale 57
   b. Muqueuse et bulbe olfactif 58
   c. Cortex piriforme 59
   d. Autres structures impliquées 60

CHAPITRE 3 : Les oscillations cérébrales 61

I. Quelques généralités 63
1. Découverte et description/caractérisation des oscillations 63
2. Analyse des oscillations 67

II. Les oscillations dans le système olfactif et le rôle clé du rythme respiratoire 69
1. Le rythme thêta et la respiration 69
2. Les rythmes bêta et gamma 70

III. Oscillations et respiration : un lien au-delà des structures olfactives 71

IV. Oscillations et conditionnement de peur **73**
1. Thêta 73
2. Gamma 74
3. Couplage thêta-gamma 74

Travail expérimental ***77***

Etude 1 : Vocalisations Ultrasonores et activités oscillatoires ***79***

Introduction aux vocalisations ultrasonores ***81***

I. Les organes de production des USV **84**

II. Le lien étroit avec la respiration **85**

III. Les différents types d'USV **87**
1. USV 22kHz : vocalisations de détresse 87
2. USV 50kHz : vocalisations de plaisir 88

IV. Le circuit impliqué dans l'initiation des USV **90**
1. Les structures clés 90
2. Les neuromodulateurs 91
   a. USV 22kHz : implication du système cholinergique 91
   b. USV 50kHz : implication du système dopaminergique 92

Publication 1 ***95***

Etude 2 : Encodage des durées et activités oscillatoires au sein du circuit neuronal de la peur ***121***

Introduction à la perception du temps et des durées ***123***

I. Que savons-nous du temps ? Comment le mesurer ? **126**
1. Le temps à différentes échelles et la mémoire temporelle 126
2. La propriété scalaire 128
3. Les différentes tâches utilisées pour étudier la mémoire temporelle 129
   a. Conditionnement opérant : Procédure de renforcement à intervalle fixe (FI) 129
   b. Procédure de bissection temporelle : discrimination temporelle 130
   c. Conditionnement associatif 131

II. Neurobiologie de la mémoire temporelle **132**
1. Striatum 133
2. Cortex préfrontal 134
3. Amygdale 136
4. Hippocampe 137
5. Cortex sensoriels 139

III. Activités oscillatoires et mémoire temporelle **140**

Publication 2 ***143***

Discussion générale et perspectives ***173***

I. La respiration est-elle le seul indice de la mémoire temporelle ? *(étude 2)* **175**
1. Les USV 175
2. Le freezing 176

3. La respiration : un indice de mémoire temporelle quelle que soit la modalité sensorielle ? 176
4. Les limites de l'utilisation de la respiration comme indice d'encodage du temps 178

II. Mémoire temporelle et mémoire de l'association *(étude 2)* 179

III. Lien entre les deux études : Rôle de l'émission des USV dans l'étude 2 ? *(études 1 et 2)* 180

IV. Analyses restant à faire et perspectives *(études 1 et 2)* 181

1. Analyse des activités oscillatoires 181
2. Inhibition de voies de projections dans le réseau 182
3. Rôle de l'hippocampe 184

***Bibliographie* 187**

***Publications et conférences scientifiques* 217**

I. Publications en lien avec le travail de thèse 219

II. Présentations orales 219

III. Présentations affichées 219

***Annexe 1 - Highlight research paper* 221**

***Annexe 2 - Research article summary (Sfn Journals)* 227**

***Annexe 3 – Table des illustrations* 233**

Avant-propos et présentation de la thèse

L'émotion de peur déclenche un large éventail de réponses de défense qui permettent à l'organisme d'optimiser sa réponse comportementale face au danger. La peur peut être générée par un ensemble de stimuli naturellement aversifs ou par des stimuli ayant acquis une valeur aversive par apprentissage associatif. Le conditionnement pavlovien de peur est l'une des tâches les plus utilisées pour étudier la formation des mémoires émotionnelles et les réponses de défense qui en découlent chez l'animal. Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé un conditionnement de peur à l'odeur chez le rat pour qui l'olfaction est la modalité sensorielle dominante. Dans ce conditionnement l'arrivée d'une odeur est suivie après un intervalle de temps fixe, d'un stimulus aversif. L'animal apprend très vite le lien causal ainsi que les relations temporelles entre les deux évènements. Cela se traduit par le développement d'une réponse de peur à l'odeur caractérisée par différents comportements tels que l'immobilité de peur (désignée par le terme anglais de freezing), l'émission de vocalisations ultrasonores, ou des variations du rythme respiratoire. La thématique globale de cette thèse concerne l'étude de la dynamique des activités cérébrales pendant l'expression des réponses de peur dans le conditionnement de peur à l'odeur.

Ce manuscrit débute par une introduction générale de trois chapitres. Au cours du premier chapitre nous introduirons la mémoire, les émotions et en particulier la peur, et la mémoire émotionnelle. Nous aborderons ensuite au cours d'un deuxième chapitre la neurobiologie du conditionnement de peur à l'odeur. Dans ce chapitre, nous présenterons rapidement le système olfactif avant de nous intéresser aux circuits du conditionnement de peur. Nous commencerons par le conditionnement de peur au son, qui est le conditionnement majoritairement utilisé dans la littérature. Nous finirons ce chapitre par un résumé des quelques connaissances actuelles sur les circuits cérébraux impliqués dans le conditionnement de peur à l'odeur. Enfin, le troisième chapitre sera consacré aux oscillations cérébrales. Nous décrirons ce que sont les oscillations cérébrales et comment elles sont analysées dans le but d'étudier les réseaux neuronaux. Nous ferons ensuite un état de l'art sur les oscillations dans le système olfactif, où nous verrons le rôle important de la respiration sur les dynamiques oscillatoires. Enfin, nous ferons le point des connaissances actuelles sur les activités oscillatoires dans le conditionnement de peur.

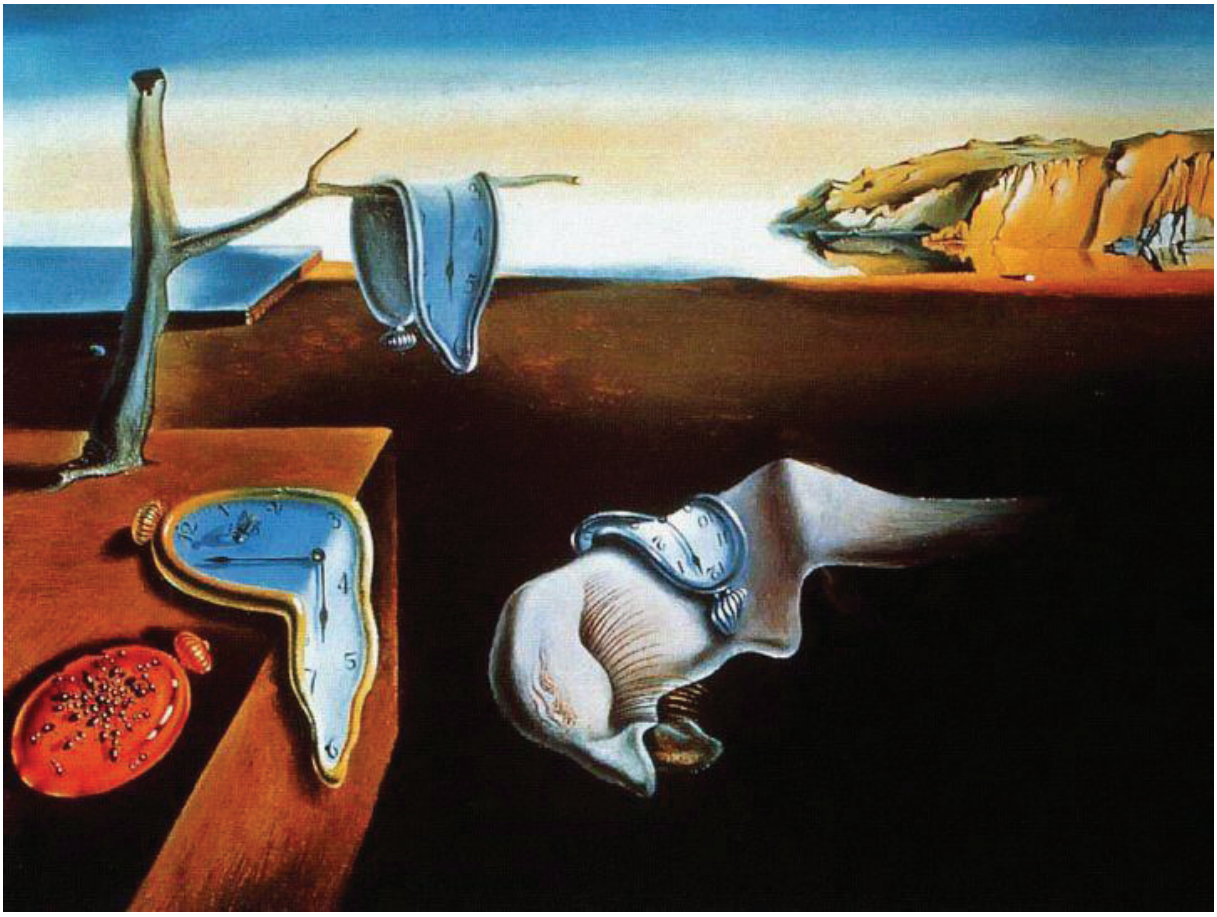
La partie expérimentale de cette thèse comprend deux études qui seront chacune introduites par un chapitre spécifique. La première étude s'intéresse à l'une des réponses de peur du rat émise lorsqu'il est confronté à un stimulus aversif, les vocalisations ultrasoniques, et à l'impact de leur production sur les activités oscillatoires dans le réseau de la peur. En effet, parmi le panel de réponses de peur exprimées chez le rat, l'influence du comportement de freezing sur les oscillations cérébrales a été récemment décrite, mais aucune étude à notre connaissance n'a examiné celle des vocalisations ultrasoniques. Le but de cette première étude a donc été de rechercher si l'émission de vocalisations ultrasoniques coïncidait avec des changements d'activités oscillatoires dans le réseau impliqué dans les mémoires de peur. Par ailleurs, il est connu que l'émission des vocalisations ultrasoniques s'accompagne de modifications du rythme respiratoire, et récemment, des études suggèrent que ce même

rythme pourrait moduler les activités oscillatoires. Nous avons donc cherché à savoir si les changements de puissance des activités oscillatoires observés lors de l'émission de vocalisations ultrasonores étaient liés à des changements du rythme respiratoire. L'exposé de cette étude est précédé d'une introduction aux vocalisations ultrasoniques, présentant ce que l'on sait de leurs organes de production, du lien étroit qu'elles entretiennent avec la respiration, des différents types existants et enfin des circuits et neuromodulateurs intervenant dans leur genèse.

La deuxième étude s'est intéressée aux circuits neuronaux qui sont impliqués dans l'encodage du temps dans le conditionnement de peur à l'odeur. En effet, dans cet apprentissage, l'animal apprend non seulement que l'odeur prédit le stimulus aversif, mais il apprend également à quel moment précis ce stimulus arrive. Cette capacité d'encodage des relations temporelles entre les évènements est considérée par certains auteurs comme étant à la base des apprentissages associatifs, et se ferait dès les premières associations. Cependant les bases neuronales qui sous-tendent cet encodage sont encore très peu connues. Le but de cette étude a donc été dans un premier temps de mesurer au niveau comportemental, la performance temporelle des animaux dans le conditionnement de peur à l'odeur. Pour cela nous avons étudié le décours temporel de la fréquence respiratoire de l'animal pendant l'intervalle de temps qui sépare l'arrivée de l'odeur du stimulus aversif. Puis nous avons recherché si cette courbe de la respiration était associée à un décours temporel de la puissance des activités oscillatoires dans le réseau de structures impliquées dans les mémoires de peur. L'exposé de cette étude est précédé d'une introduction présentant la mémoire temporelle, les tâches utilisées pour la tester, le réseau de structures cérébrales impliqué et l'état de l'art concernant les activités oscillatoires au sein de ce réseau.

Introduction générale

CHAPITRE 1 : Mémoire, émotions, mémoire émotionnelle



La Persistance de la mémoire, tableau surréaliste peint par Salvador Dali (1931).

Note sur l'œuvre *: La mémoire est notamment représentée ici par le biais du souvenir dans le choix du paysage (port de Lligat, près de Cadaquès) qui rappelle à Dali sa jeunesse passée en Catalogne. La mémoire est ce qui permet de conserver une trace du passé, d'une certaine manière de figer le fugitif, de fixer l'éphémère. Le paradoxe initial représenté par les montres n'en est plus un : le temps passe, c'est un fait, et la mémoire est l'outil le plus à même de répondre à la frustration de l'homme de ne pouvoir figer le temps. Plus que la mesure du temps, Dali propose ici la mémoire comme moyen pour l'homme de s'inscrire dans le temps qui passe comme le montre l'utilisation de son propre souvenir dans le choix du paysage.*

« Il faut commencer à perdre la mémoire, ne serait-ce que par bribes, pour se rendre compte que cette mémoire est ce qui fait notre vie. Une vie sans mémoire ne serait pas une vie (...) Notre mémoire est notre cohérence, notre raison, notre sentiment, et même notre action. Sans elle, nous ne sommes rien (...) ».

Luis Bunuel, 1982, *Mon dernier soupir*.

I. Qu'est-ce que la mémoire ?

C'est aujourd'hui grâce à votre mémoire que vous vous rappelez qui vous êtes, de l'endroit où vous avez rangé vos clés, que vous savez écrire, qui sont vos parents, et que vous pouvez fredonnez vos chansons préférées sous la douche. La mémoire construit aussi bien l'identité que les connaissances, l'intelligence, la motricité, l'affectivité, etc… de chacun d'entre nous. Georges Chapouthier, philosophe et directeur de recherche au CNRS, écrivait même que « *lorsqu[e la mémoire] s'effondre, nous en perdons notre identité* ».

Figure 1 : *Illustration par Martin Singer tirée du blog Better Than Life*

Mais cette conception de la mémoire a beaucoup évolué au fil des siècles. Les premières traces des questionnements la concernant remontent bien avant l'émergence des sciences expérimentales.

Afin de tenter de définir la mémoire, explorons ensemble, de manière non exhaustive, les souvenirs de plusieurs années de recherche sur la mémoire.

1. Bref historique de la recherche sur la mémoire

Qu'est-ce que se souvenir ? Les mécanismes psychiques et neurologiques par lesquels nous nous rapportons à ce que nous avons temporairement oublié font l'objet de nombreuses investigations scientifiques aiguillées par la nécessité thérapeutique et/ou l'intérêt économique. Mais avant d'être un concept neuroscientifique, la mémoire était une notion animant les joutes oratoires entre philosophes dès l'antiquité grecque.

Portrait 1 : *Platon (428-348 avant notre ère)*

Dans *Le Théétète*, Platon (428-348 avant notre ère, Portrait 1) décrit la mémoire comme une sorte de papyrus, de support sur lequel se déposent les connaissances en évoquant une « *cire* » qui, lorsqu'elle est « *épaisse, abondante, lisse et pétrie avec mesure* » permet aux sensations extérieures qui arrivent via notre corps, de s'imprimer sur le « *cœur de l'âme* ». Ceux dont une telle cire demeure encrassée, velue ou trop dure demeureront ignorants, incapables de conserver en eux-mêmes l'empreinte nette de la perception passée. La mémoire n'est alors qu'un lieu de stockage, un processus rétentionnel dont l'âme prélève les empreintes pour les comparer à chaque nouvelle sensation qui pourrait lui ressembler.

Mais cette image de la mémoire ne permet pas de savoir comment apprendre quelque chose de nouveau, qui ne ressemble à aucune empreinte sur notre papyrus. Platon, dans *Le Ménon*, introduit alors la notion de *réminiscence* (*anamnésis*). Cette théorie affirme que notre connaissance de la vérité est le souvenir d'un état ancien où, avant d'être incarnée dans un corps, notre âme vivait au contact immédiat des pures idées dans le monde intelligible. Seulement, à l'incarnation dans un corps, nos connaissances se couvrent d'un voile d'oubli. Ainsi, pour Platon, connaître c'est se souvenir, se remémorer, lever ce voile. La mémoire est l'opération essentielle qui permet de lever ce voile pour accéder à la connaissance.

Plusieurs siècles plus tard, au 17ème siècle, Descartes (Portrait 2) postulait que la mémoire était une fonction spécifiquement humaine (Il serait étonné de voir ce dont nos rats de laboratoire sont capables !). Mais pourquoi pensait-il cela ? Tout simplement car pour lui, le corps et l'esprit étaient deux entités distinctes entre lesquelles les interactions étaient possibles. L'âme, absente chez les animaux, serait le siège de la mémoire (il proposa même la glande pinéale comme support de cette âme). Tandis que l'Homme capable de raisonner adapterait sa conduite aux nouvelles situations en les comparant à celle déjà en mémoire, les animaux n'auraient que des comportements réflexes. Comme Platon, Descartes envisageait la mémoire comme une fonction supérieure de l'Homme lui permettant d'adapter ses comportements et d'accéder à la réflexion.

Portrait 2 : *René Descartes (1596-1650)*

Ces quelques théories philosophiques ne furent bien entendu par les seules, et jusqu'au 19ème siècle les études sur la mémoire restèrent essentiellement théoriques et ne quittèrent pas la sphère philosophique.

Dès l'avènement des sciences expérimentales, un tournant s'opéra dans les mentalités et la mémoire fut appréhendée non plus seulement comme un concept philosophique, mais comme une fonction quantifiable/mesurable.

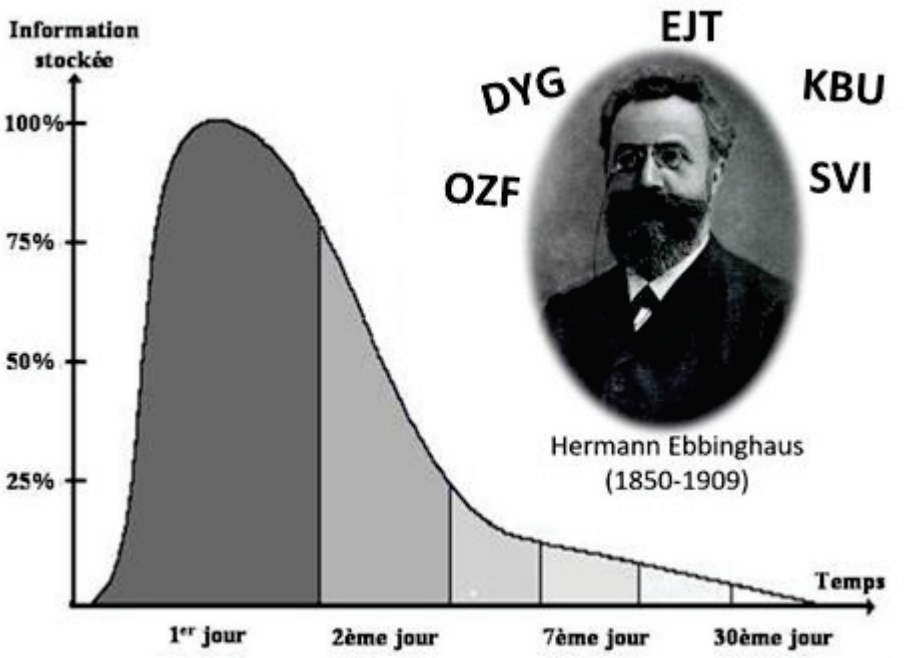


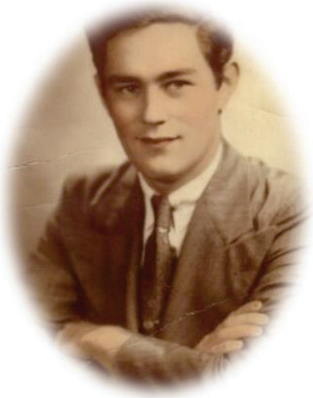
Figure 2: *Courbe de l'oubli d'Ebbinghaus*

C'est en 1885 qu'est publiée la première étude sur la mémoire, par le psychologue allemand Hermann Ebbinghaus qui établit notamment la première courbe de l'oubli (Figure 2) en testant sur lui-même la rétention d'une liste de syllabes (sans aucune signification) à différentes durées. Il conclut que le stockage des informations acquises dans une session diminue avec le temps (sans répétition des informations, nous en oublions environ 50% dès le lendemain, et 90% après un mois). D'autres après lui aborderont cette notion d'oubli, primordiale dans la mémoire, comme Williams James (1890) ou encore Henri Bergson (1888). C'est également à cette époque que l'on retrouve les premières études sur des sujets humains souffrant d'amnésie. Pour ne citer que les principales, nous pouvons rapporter celle concernant le cas de la patiente B.S. du médecin et psychologue Edouard Claparède (Portrait 3).

Portrait 3 : *Edouard Claparède (1873-1940)*

B.S. était atteinte du syndrome de Korsakoff, qui touche les régions cérébrales médianes, et qui présente comme symptôme une amnésie sévère. Par exemple, elle ne reconnaissait pas le docteur Claparède qui pourtant la suivait depuis plusieurs années. Un jour lors d'une consultation, E. Claparède dissimula dans la paume de sa main une épingle avec laquelle il piqua la patiente lorsqu'il la salua. Lors de la consultation suivante, lorsque le docteur tendit sa main à B.S., celle-ci retira aussitôt la sienne. Mais quand le docteur

Claparède demanda les raisons de son geste, elle était dans l'incapacité de donner une explication. Elle avait donc stocké des traces de son expérience passée, mais sans aucun souvenir conscient. C'est ainsi que E. Claparède suggéra l'idée qu'il y aurait au moins deux types de mémoire, une mémoire du soi, implicite, qui repose sur la perception entre les choses et soi-même (fonction egocentriques), et une mémoire des choses, explicite, qui repose sur la perception des relations entre les choses (fonctions périphériques). Dans le cas de la patiente B.S., le premier type de mémoire serait intact.



Portrait 4 : *Henry Gustav Molaison (1929-2008)*

Suite à cette étude, de nombreuses ont suivi, mais un tournant dans la neurobiologie de la mémoire a vraiment eu lieu avec le patient H.M. (Portrait 4). Henry Gustav Molaison (H.M.) a 9 ans lorsqu'il est victime d'un accident de vélo. Cet accident a été le point de départ d'une forme d'épilepsie sévère pour laquelle il sera opéré 18 ans plus tard en 1953 pour retirer les foyers épileptiques situés dans les hippocampes et les tissus environnants des lobes temporaux. Malheureusement à son réveil, on constate que le patient HM est incapable de former de nouveaux souvenirs : il souffre d'une amnésie antérograde. Il souffre également d'amnésie rétrograde quasi-totale, puisqu'il ne se souvient plus de plusieurs années de sa vie précédant l'opération (environ 11 ans). En revanche, l'ensemble de ses capacités intellectuelles sont préservées, et il ne souffre d'aucun trouble de la personnalité.

A partir de 1957, HM devint le sujet de nombreuses études scientifiques sur la mémoire, c'était l'un des premiers patients pour lesquels les déficits mnésiques pouvaient être corrélés à un dommage cérébral localisé, contrairement à la patiente de E. Claparède. Ces expériences ont montré l'importance du type d'information à mémoriser, qui définit alors les structures cérébrales impliquées dans cette mémorisation.

Portrait 5 : *Brenda Milner (1918)*

L'une des expériences qui appuya cette idée est celle de Brenda Milner en 1962 (Portrait 5). Elle demanda au patient H.M. de reproduire le dessin d'une étoile à 5 branches uniquement à l'aide du reflet de sa main et de la feuille de dessin dans un miroir (Figure 3). Cette tâche est plus difficile qu'il n'y parait, mais après plusieurs essais, H.M. améliora nettement ses performances sans pour autant garder de souvenir des essais antérieurs : il oubliait qu'il avait déjà fait le test. Ceci soutient donc l'hypothèse qu'il y a une distinction entre une mémoire consciente verbalisable, et une mémoire reposant sur les habiletés motrices.

On commença alors à préciser l'implication de structures clés dans les différents types de mémoire, bien qu'il serait très réductionniste et illusoire de penser qu'une structure est associée à un type de mémoire en particulier.

Figure 3 : *Tâche de suivi de l'étoile à 5 branches à travers le miroir (Biological Psychology 6e, Figure 17.2).*

2. La mémoire aujourd'hui : des systèmes de mémoire multiples

L'ensemble de ces années d'expérimentations a permis d'aboutir à la conception actuelle de la mémoire, qui est définie non plus comme UNE mémoire mais DES mémoires. Ces mémoires concernent des types de connaissances différentes et sont sous-tendues par des réseaux cérébraux distincts. Ces différents types de mémoire permettent d'utiliser des connaissances acquises et conservées, mais le type de connaissances qu'ils gèrent et la façon dont elles ont été acquises ainsi que les réseaux neuronaux mis en jeu sont différents (Tulving, 1985).

Une première grande distinction a été faite dès 1980 par Neal Cohen et Larry Squire entre deux types de mémoire : la mémoire déclarative ou explicite (le « savoir que ») et la mémoire non déclarative ou implicite (le « savoir comment », « savoir-faire ») (Figure 4).

La mémoire déclarative est la mémoire à laquelle on se réfère dans la vie de tous les jours, c'est « *le type de mémoire auquel se réfère le mot mémoire dans le langage courant* » selon Squire (2004). On peut distinguer deux sous-types dans cette catégorie : la mémoire épisodique et la mémoire sémantique.

- La mémoire épisodique me permet de raconter que je suis allée au concert de Phil Collins quelques jours avant d'écrire ces lignes, qu'il se tenait au stade de Décines, qu'il y avait beaucoup de monde et énormément de vent. C'est la mémoire des évènements vécus personnellement, qui vont être automatiquement replacés dans leur contexte (date, lieu, personnes qui étaient présentes à ce moment, etc.).
- La mémoire sémantique me permet de me souvenir que l'anniversaire de ma maman est le 28 janvier, du nom de mon instituteur en CE2, que le guépard est le seul félin aux griffes non rétractiles ou que l'arbre sur lequel pousse les kiwis s'appelle un actinidier (*Actinidia chinensis*). C'est la mémoire des connaissances « représentables » que l'on a du monde et de nous-même, celle qui va aussi vous permettre de passer des tests de culture générale avec brio.

La mémoire non déclarative est la mémoire qui porte sur les habiletés perceptives, motrices ou cognitives. Les informations qu'elle stocke sont utilisées sans faire appel à un rappel conscient. On peut là encore subdiviser cette mémoire en plusieurs sous-types :

- Parmi elle, la mémoire procédurale, celle qui va me permettre de venir en vélo au laboratoire sans avoir à réfléchir à appuyer sur les pédales ou tenir l'équilibre comme mon père me l'a appris.
- On retrouve également la mémoire d'amorçage. Ce terme, développé par Meyer et Shavaneveldt en 1971, désigne le fait d'influencer par exemple l'identification d'un stimulus grâce à la présentation, consciente ou non, d'autres stimuli en amont (comme des mots ou des images) qui ont un lien avec le premier stimulus. Prenons un exemple d'amorçage, l'amorçage sémantique : Il sera plus facile pour vous de lire « des frères et sœurs » que « des frères et des arbres ». L'amorçage sémantique se produit car l'amorce (ici frère) active partiellement des mots ou des concepts apparentés et facilite alors leur traitement (ou reconnaissance) ultérieure.
- La mémoire perceptive est celle qui nous permet d'interpréter et de stocker les informations perçues grâce à nos cinq sens. Elle est indispensable par exemple aux chefs cuisinier lorsqu'il s'agit d'imaginer le goût qui résulterait de telle ou telle association de saveurs.
- La mémoire associative est la mémoire des conditionnements associatifs classiques. C'est celle qui fait que j'ai maintenant de l'appréhension à la vision d'une pastèque depuis que je me suis ouvert la main en en coupant une.
- La mémoire non associative, qui correspond à des formes d'apprentissage se manifestant par l'augmentation ou la disparition d'une réponse face à la répétition d'un stimulus (habituation). Par exemple, le fait de ne plus sentir les boucles d'oreilles que l'on porte depuis un petit moment ou encore son propre parfum.

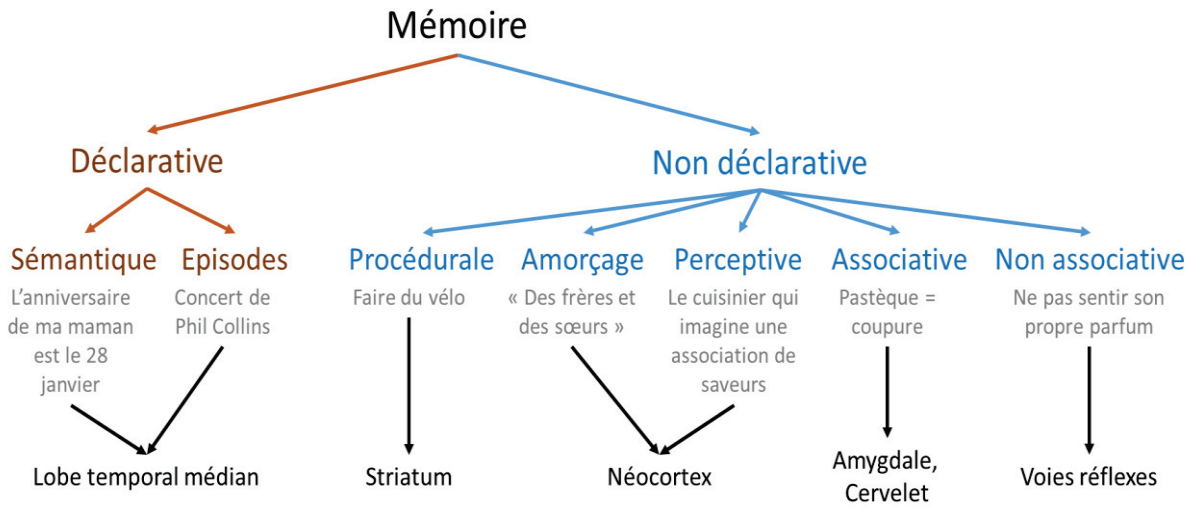


Figure 4 : *Les différents systèmes mnésiques et les structures clés impliquées (adaptée de Squire (2004)).*

Le suivi neuropsychologique des patients amnésiques après la chirurgie a permis d'étayer les connaissances sur les structures cérébrales qui seraient impliquées dans ces différents types de mémoire. Ainsi, les nombreuses études réalisées sur le patient HM, notamment par Brenda Milner et Suzanne Corkin, et l'examen post-mortem de la nature précise des ablations chirurgicales (Annese et al, 2014 ; Thiebaut de Schotten et al., 2015), ont permis de conclure que l'intégrité du lobe temporal médian, et plus particulièrement de l'hippocampe et des cortex parahippocampiques, était nécessaire à la formation et au maintien des mémoires déclaratives.

Malheureusement (ou plutôt fort heureusement !), ce type de patient avec des lésions relativement localisées, est très rare. Lorsque la lésion s'étend aux structures avoisinantes, l'interprétation du lien entre structure et type de mémoire est plus délicate.

La nécessité de développer des modèles animaux a donc vite émergé dans l'essor des neurosciences expérimentales. En effet, contrairement au modèle humain, le modèle animal présente l'avantage du contrôle fin de la localisation de la lésion par l'expérimentateur. La difficulté réside alors dans la capacité à établir un protocole testant chez l'animal le même type de mémoire que chez l'Homme.

Au vu de la multiplicité des systèmes de mémoire existants, nous n'allons pas développer ensemble les procédures expérimentales mises au point sur le modèle animal permettant de les étudier, ce serait bien trop vaste et hors de notre champ d'étude. Nous allons nous focaliser sur un type de mémoire en particulier qui est celui sur lequel repose mon travail de doctorat : la mémoire associative. C'est la mémoire qui permet d'associer des stimuli, des évènements, des comportements, des objets, etc… Par exemple, j'associe une odeur particulière à la pluie, ou encore le fait d'éteindre la lumière quand je sors d'une pièce. Cette mémoire est le reflet d'un apprentissage associatif.

L'enjeu est alors de mettre en place une procédure visant à tester cette mémoire associative. En 1898, Thorndike (Portrait 6, à gauche) proposa le protocole suivant : il plaça un chat dans une cage à l'extérieur de laquelle se trouvait un bol de nourriture visible par celui-ci. Le chat devait alors actionner un levier à l'intérieur de la cage pour déclencher le mécanisme d'ouverture de celle-ci et ainsi accéder à la nourriture. Thorndike mesura alors, pour chaque répétition de l'expérience, le temps que l'animal mettait à ouvrir la cage en actionnant le levier. Si l'animal avait bien fait l'association, il mettait très peu de temps pour l'ouvrir. Il s'agit de ce que l'on nomme la *Loi de l'Effet* : « *les réactions qui produisent un effet satisfaisant dans une situation*

Portrait 6 *: A gauche, Edward Thorndike (1874-1949); à droite, Burrhus Frederic Skinner (1904-1990)*

particulière sont plus susceptibles de se reproduire dans cette situation alors que celles entraînant un effet gênant le sont moins » (Gray, 2011, p108-109).

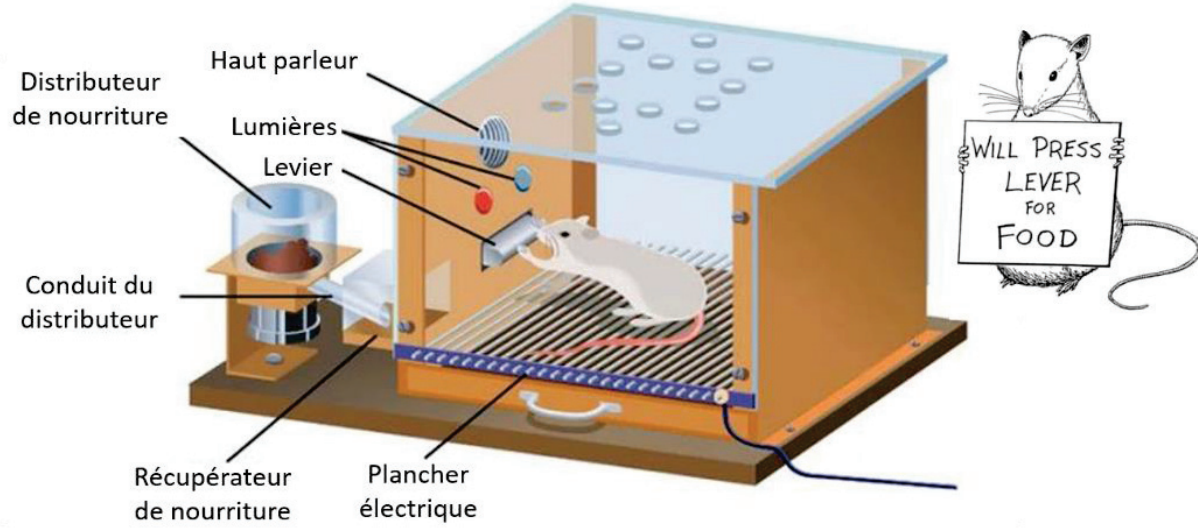


Figure 5 : *Schéma du dispositif expérimental de la boîte de Skinner*

Ce paradigme expérimental est ce que l'on appelle un conditionnement opérant, impliquant une réponse instrumentale (l'appui sur le levier). Burrhus Frederic Skinner (Portrait 6, à droite) s'est fortement inspiré de ce protocole pour construire la célèbre « boîte de Skinner » (1938; Figure 5), dans laquelle un rat apprend à appuyer sur un levier pour que de la nourriture lui soit délivrée (avec ou non des stimuli visuels ou auditifs lui indiquant à quel moment appuyer sur le levier). Ce dispositif est encore aujourd'hui utilisé dans de nombreuses études qui s'intéressent à la neurobiologie de la mémoire. Il permet de tester une association entre une action et ses conséquences.

Portrait 7 : *Ivan Pavlov (1849-1936)*

En parallèle, à peu près à la même époque (1927), Ivan Pavlov (Portrait 7) met au point le conditionnement classique permettant d'étudier l'association entre deux évènements ou stimuli mais dans lequel il n'y a pas de réponse instrumentale à produire. Pavlov observa que lorsqu'il plaçait de la poudre de viande sur les muqueuses buccales de son chien, celui-ci salivait automatiquement. Cette réponse de salivation est spontanée et ne nécessite donc pas d'apprentissage. La poudre de viande est ce que l'on appelle un stimulus inconditionnel, c'est-à-dire un stimulus signifiant pour l'animal. La réponse de salivation quant à elle fait partie des réponses inconditionnées et est provoquée automatiquement par le stimulus inconditionnel.

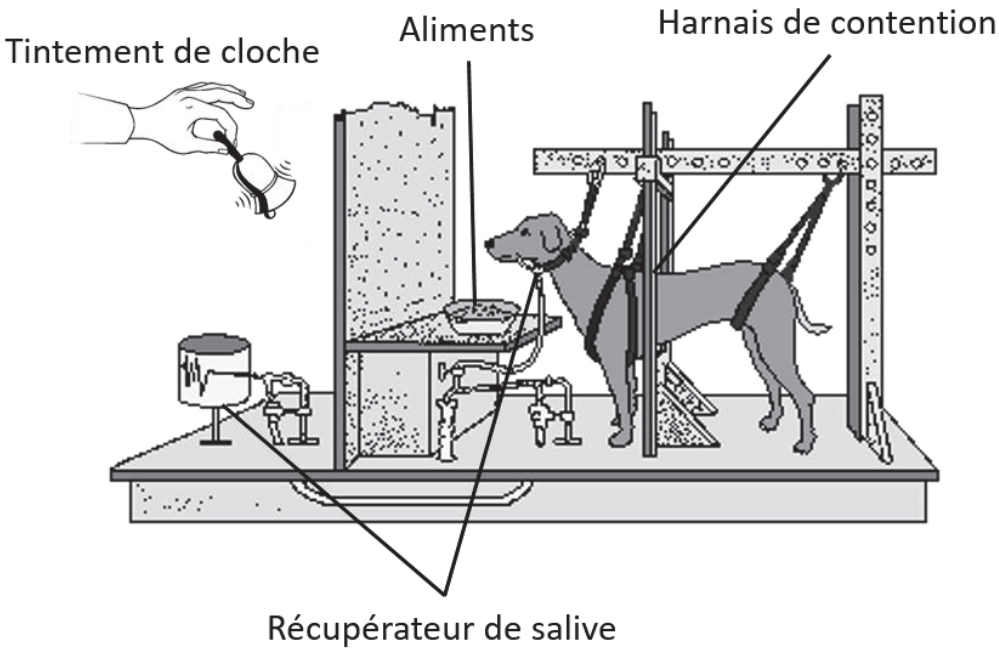


Figure 6 : *Schéma du dispositif expérimental de l'expérience de conditionnement associatif appétitif de Pavlov (adaptée de Wikipédia)*

Pavlov plaça alors son chien dans un harnais de contention équipé d'un système de récupération de la salive (Figure 6). Il répéta pendant plusieurs jours la chose suivante : il faisait tinter une clochette puis donnait de la poudre de viande à son chien. Le son de la clochette était initialement neutre pour l'animal et n'entrainait pas de comportement particulier chez lui. C'est un stimulus conditionnel. Après quelques répétitions de cette association clochette-poudre de viande, le tintement de la clochette suffisait à lui seul à déclencher le mécanisme de salivation. Le chien avait appris le lien causal entre ce son et la nourriture. Le stimulus conditionnel (le tintement de la clochette) était devenu prédictif du stimulus inconditionnel la poudre de viande) ; la salivation, une réponse conditionnée (car induite par le stimulus conditionnel).

Notons que les animaux ne sont pas les seuls à pouvoir apprendre par association, des chercheurs australiens (Gagliano et al., 2016) ont montré que les plantes en étaient également capables ! Dans leur expérience, ils ont utilisé des jeunes plants de pois qu'ils ont placé dans un labyrinthe en Y (Figure 7). Ils ont utilisé une lampe comme stimulus inconditionnel (la lumière est vitale pour effectuer la photosynthèse), et un ventilateur comme stimulus conditionnel (le vent n'est pas utile pour la plante, mais peut tout de même être détecté par celle-ci). Dans un premier cas, ils ont mis la lampe et le ventilateur dans la même branche du labyrinthe, dans le deuxième cas un dans chaque branche. Les plants de pois poussaient alors dans les deux cas du côté de la lumière. Ils ont alors cherché à voir si les plants avaient associé la lumière au vent en enlevant la source lumineuse et en observant de quel côté les plants poussaient. Dans les deux cas, les plants poussent du côté où il y avait initialement la lumière, ce qui montre que dans le premier cas, les plants ont bien associé le vent (qui serait la clochette dans l'expérience de Pavlov) à la lumière (la poudre de viande).

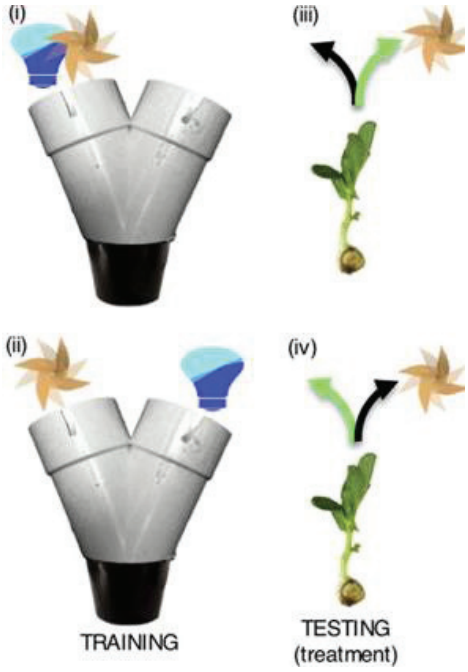


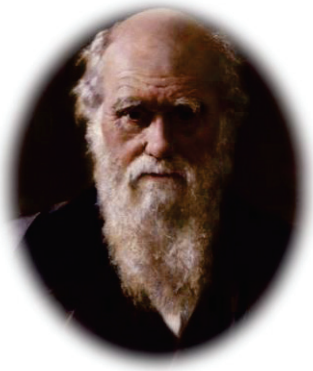
Figure 7 : *Dispositif expérimental du conditionnement associatif chez les plantes (Gagliano et al., 2016)*

Le conditionnement pavlovien chez l'animal comme paradigme d'apprentissage associatif se distingue du conditionnement opérant entre autre par le fait qu'aucune réponse instrumentale n'est nécessaire. Il est aujourd'hui grandement utilisé pour l'étude de la neurobiologie de la mémoire et plus particulièrement dans celle des apprentissages émotionnels.

II. La mémoire émotionnelle

1. Les émotions

Le mot émotion vient du latin *motio* qui signifie « mouvement » et *e-* qui signifie « qui vient de ». Etymologiquement, l'émotion est donc un mouvement provoqué par une excitation extérieure. En effet, qui n'a jamais eu peur face à une voiture arrivant droit sur soi à vive allure ou bien rougi au moment de prendre la parole face à un auditoire ? Ces stimulations extérieures (voiture, auditoire, etc…) sont à l'origine de ressentis intérieurs qui vont guider grandement nos réactions dans de nombreuses situations. En ce sens, les émotions sont facilement repérables par les modifications végétatives qu'elles provoquent : le bond d'un mètre face à la voiture ou bien la jolie couleur tomate de votre visage face à votre auditoire n'aura laissé personne dupe. LeDoux déclarait d'ailleurs "*La plupart, si ce n'est toutes les émotions, font intervenir une réponse corporelle*" (1996).



Portrait 8 : *Charles Darwin (1809-1882)*

Cette idée avait été développée depuis longtemps par Charles Darwin (Portrait 8) dans son ouvrage portant sur la façon dont les animaux et les humains expriment et signalent aux autres leurs émotions (*The expression of emotions in mans and animals*). Dans cet ouvrage, il étudia les postures du corps, mais aussi de la face (et les muscles la composant) des hommes et des animaux dans le but de constituer un langage de la physionomie qui serait universel et immuable : « les individus jeunes et âgés de races très différentes, tant chez l'Homme que chez l'animal, expriment le même état d'esprit par les mêmes mouvements » (Figure 8).

Figure 8 *: L'expression des émotions chez l'Homme et les animaux (1872) par Charles Darwin. Ici, trois espèces différentes exprimant l'émotion de peur.*

Les émotions font partie intégrante de notre quotidien, modifient de façon temporaire notre physionomie comme nous venons de le voir, mais aussi notre comportement. Pourtant leur étude, du fait de l'héritage culturel qui scinde d'une part cognition et émotion, et de l'autre cerveau et esprit, a longtemps été écartée du domaine des neurosciences pour être confinée au domaine de la psychologie et des maladies mentales et le rôle du cerveau dans ces émotions a largement été occulté. Mais comment définir une émotion ?

Pour Joseph LeDoux (1996), émotions et sentiments se confondent : *« An emotion is a subjective experience, a passionate invasion of consciousness, a feeling*». A contrario, Antonio Damasio (1999, *Le Sentiment même de soi*) insiste sur la distinction à établir entre ces deux termes : « *Les émotions sont des actions. Certaines se traduisent par des mouvements des muscles du visage, comme des expressions faciales de joie, de colère, etc…, ou du corps, la fuite ou la posture agressive. D'autres se traduisent par des actions internes, comme celles des hormones, du cœur ou des poumons. Les émotions sont donc d'une certaine façon publiques, on peut les mesurer, les étudier. Les sentiments, par contre, sont privés, subjectifs. Ils sont ressentis par l'individu et lui seul. Il ne s'agit pas de comportements mais de pensées* ».

Quelle que soit la taxonomie adoptée pour les décrire, ces modifications physiologiques et comportementales sont contrôlées par le cerveau et ont été sélectionnées

au cours de l'évolution car elles sont garantes de la survie de l'espèce et assurent sa pérennité. C'est cette définition que nous garderons ici pour le reste de notre étude.

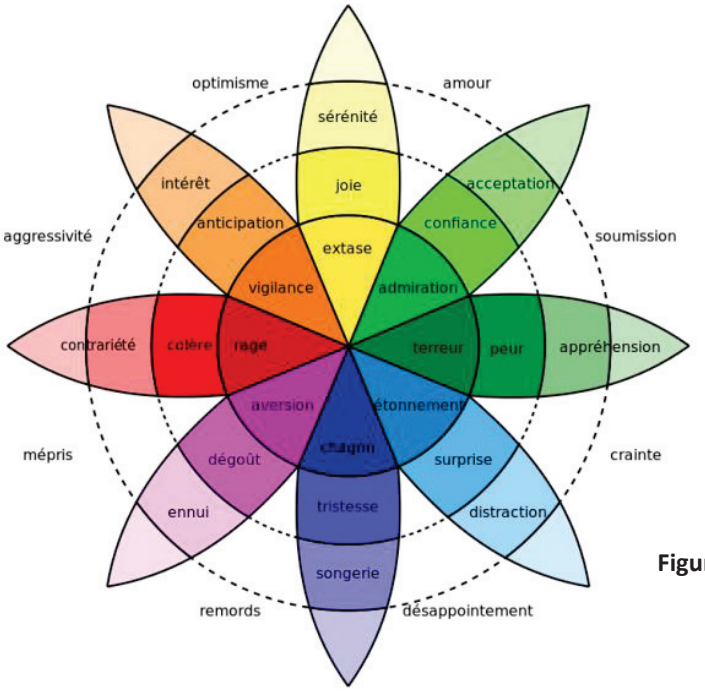


Figure 9 : *La roue des émotions selon Plutchik*

En partant de ce postulat, on peut définir différentes sortes d'émotions (Joseph LeDoux, *The Emotional Brain* ; 1996) :

• Les émotions simples/primaires : Elles vont s'accompagner d'expressions faciales ou gestuelles universelles sans impact de l'éducation ni même de la culture, bien décrites par Charles Darwin. Elles seraient au nombre de six selon Paul Ekman (1984) : le bonheur (joie), la peur, la colère, la tristesse, la surprise et le dégout.

• Les émotions complexes : Elles seraient la résultante de la combinaison de plusieurs émotions primaires. Par exemple, Plutchik définit le remord comme un mélange de tristesse et de dégout, la crainte comme une combinatoire de peur et de surprise. Ces associations sont représentées sur la roue des émotions qu'il a alors établie (Figure 9).

Les émotions ont longtemps été décrites essentiellement chez l'Homme. En effet, bien avant l'émergence de l'éthologie, Descartes notamment, conseillait de traiter les animaux comme des machines insensibles. L'anthropomorphisme était alors considéré comme un péché scientifique majeur : parler d'émotions chez les animaux pouvait mettre un terme à une carrière scientifique ! Ces théories philosophiques et scientifiques d'animal-machine (ou mécanomorphisme), se sont pourtant vues mises à mal avec l'avènement de nombreuses études montrant que les animaux possèdent également des émotions complexes, comme par exemple de l'empathie (pour revue voir De Waal et Preston, 2017). Et heureusement pour nous les neuroscientifiques, car ceci fut fort utile pour étudier la mémoire émotionnelle ! En

sciences expérimentales chez l'animal, dans les paradigmes testant la mémoire émotionnelle, c'est la peur qui est très souvent utilisée car c'est l'émotion la plus facile à objectiver.

2. La peur

« L'homme effrayé commence par se figer comme une statue, immobile et sans respirer, ou s'accroupit comme instinctivement pour échapper au regard d'autrui. Le cœur bat violemment, et palpite ou bat contre les côtes… Les poils sur la peau se dressent ; et les muscles superficiels frissonnent. Du fait du changement de rythme cardiaque, la respiration est accélérée… La bouche devient sèche, est souvent ouverte et fermée. »

Charles Darwin, L'Expression des émotions chez l'homme et les animaux (1872).

a. Qu'est-ce que la peur ?

La peur est une réaction innée, déclenchée lorsque l'organisme perçoit ou anticipe un danger. C'est cette frayeur par exemple que vous allez ressentir quand, au détour d'un chemin de montagne, vous tombez nez à nez avec une vipère. Votre pouls s'accélère, vous vous figez, peut-être même que votre respiration s'emballe : vous avez peur. Cet exemple illustre bien ce système d'alarme qui nous prévient face au danger et qui prépare notre organisme pour nous y soustraire ou l'affronter.

La peur fait partie des émotions les plus conservées au cours de l'évolution et est largement partagées au sein de l'arbre phylogénétique puisqu'elle permet la survie et la pérennité des espèces. Elle peut être déclenchée par une large variété de stimuli, comme des prédateurs, des individus agressifs de la même espèce, une douleur, un bruit intense et soudain… Ces divers stimuli vont induire de manière systématique (si l'on écarte les comportements pathologiques) toute une palette de réactions de défense innées qui sont spécifiques de l'espèce considérée (Bolles, 1970).

b. Les réponses de défense

Bolles propose que le rat dans son environnement naturel doit apprendre à se défendre dans de nombreuses situations et il a ainsi développé un répertoire de réactions de défense primaires très efficaces et rapides à mettre en œuvre. Selon lui, lorsque le rat perçoit un danger imminent, son répertoire de réponses comportementales se réduit de façon drastique et se limite aux réactions de défense primaires au détriment des autres comportements comme l'exploration, le toilettage, la recherche de nourriture, etc… Ces réactions de défense primaires dépendent de l'imminence du danger (Fanselow, 2018), et de facteurs environnementaux comme la présence ou non de voies d'échappement alentour (pour revue récente, voir Mobbs, 2018). Ainsi, un danger imminent induit une réponse de fuite (Flight) si elle est possible, un comportement de dissimulation si une cachette est disponible, ou une réponse d'immobilité de peur (Freezing) si aucune de ces solutions n'est possible. Lorsque le danger s'approche et rentre en contact physique avec l'animal, il montre alors un

comportement de menace défensive en émettant des vocalisations, puis une attaque défensive (Fight). Le rat peut donc adapter sa réaction de défense afin de maximiser ses chances de survie (Blanchard et al, 2003). Nous allons décrire les trois principales réactions de défense couramment utilisées pour évaluer la réponse de peur de l'animal : le freezing, la fuite, l'attaque.

● **Le freezing**

Le freezing est considéré comme une réponse de peur universelle, qui peut être observée en réaction à une peur innée (comme l'odeur d'un prédateur) aussi bien qu'à une peur apprise. Il est défini comme une immobilité totale de l'animal, exception faite des mouvements respiratoires (Blanchard et Blanchard, 1969a).

La posture de freezing est typique (Figure 10), et elle est à différencier d'une simple immobilité calme : le rat est tassé sur lui-même, son tonus musculaire est élevé, ce qui le rend prêt à fuir ou attaquer (Blanchard et Blanchard, 1989 ; Fanselow MS, 1994 ; Kalin NH et Shelton SE, 1989). Ses oreilles sont inclinées en arrière et son poil est hérissé. Le Freezing est la réponse de peur la plus utilisée chez le rongeur car elle est facile à identifier et à quantifier de façon non invasive pour l'animal.

Figure 10 : *Posture de freezing chez le rat*

Pendant qu'ils expriment un comportement de Freezing, les rats peuvent aussi émettre des vocalisations ultrasoniques. Ces vocalisations non audibles par l'oreille humaine, sont émises par le rat dans différentes situations. Chaque situation va moduler les caractéristiques de ces vocalisations (notamment leur bande de fréquence) et en faire un marqueur de l'état émotionnel de l'animal. Chez le rat, on distingue ainsi deux catégories d'ultrasons, ceux émis à 22kHz, reflétant un état émotionnel de peur ou d'anxiété, et ceux émis à 50kHz, reflétant un état émotionnel de plaisir (Wöhr et Schwarting, 2013). Nous introduirons beaucoup plus en détail les vocalisations ultrasoniques dans notre première étude.

● **La fuite ou l'évitement**

Comme nous l'avons vu plus haut, l'animal choisira la fuite face à la menace si la situation est favorable, par exemple lors de la présence d'une échappatoire (Figure 11). La réponse inconditionnée de fuite est rarement étudiée en laboratoire. Il existe cependant un dispositif original mis au point dans le laboratoire de Jeansok Kim à Washington, pour étudier la réponse de fuite en conditions semi-naturelles (Choi et Kim, 2010). Le principe est d'utiliser

Figure 11 : *Posture de fuite chez le rat*

un robot (Robogator) qui avance brusquement lorsque le rat sort de son abri pour aller chercher une boulette de nourriture dans un corridor. Dès que le robot avance, l'animal s'enfuit et retourne dans son abri (Figure 12). Ce dispositif original a permis d'étudier les structures impliquées dans la réponse de fuite.

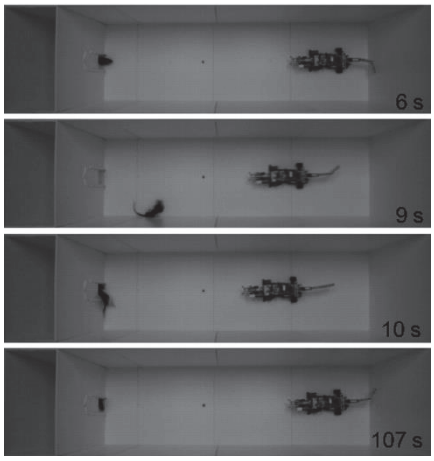


Figure 12 : *La fuite face au prédateur. Photographie montrant un rat s'approchant de la boulette de nourriture. Quand il arrive proche de celle-ci, le Robogator avance, calque une fois des dents et retourne à sa position initiale. Le rat fuit jusqu'à son abri initial.*

Hormis ce dispositif atypique, l'un des plus couramment utilisés en laboratoire pour induire une réponse de fuite est le suivant : le rat est placé dans une cage séparée en deux compartiments par une paroi verticale dans laquelle une ouverture est présente, permettant ainsi à l'animal de circuler librement d'un compartiment à l'autre. Si un choc électrique est délivré lorsque l'animal est dans l'un des compartiments, l'animal s'échappe de ce compartiment pour aller dans l'autre. C'est une réponse inconditionnée de fuite. Ce protocole de base a été enrichi pour étudier la mémoire associative en délivrant un son quelques secondes avant l'arrivée du choc électrique. Après quelques essais, la réponse de fuite va se transférer au son, on parle alors de réponse conditionnée d'évitement, et de tâche d'évitement actif.

● Le combat ou l'attaque

L'attaque défensive (par opposition à l'attaque offensive) est observée lorsque l'animal est menacé physiquement par un agresseur (Figure 13). Elle est modélisée en laboratoire par le test de « Resident-Intruder » dans lequel un rat étranger (Intrus) est introduit dans la cage d'hébergement d'un autre rat (Résident) (Koolhaas et al, 2013). Le rat résident va alors défendre son territoire et menacer le rat intrus, lequel va répondre par des comportements d'attaque défensive qui se poursuivent ensuite généralement par un comportement de soumission.

Figure 13 : *Posture de combat chez le rat*

Un autre test permet de mesure un comportement qui peut s'apparenter à de l'attaque défensive en réponse à un stimulus douloureux inanimé. C'est le comportement

d'enfouissement d'une sonde électrifiée (De Boer et Koolhaas, 2003). Le test consiste à cacher dans la litière de la cage expérimentale une sonde au travers de laquelle on peut envoyer un courant électrique. Lorsque le rat en se déplaçant reçoit un choc par cette sonde, il la recouvre de litière jusqu'à ce qu'elle ne soit plus visible.

● **Les circuits impliqués dans les réponses de défense**

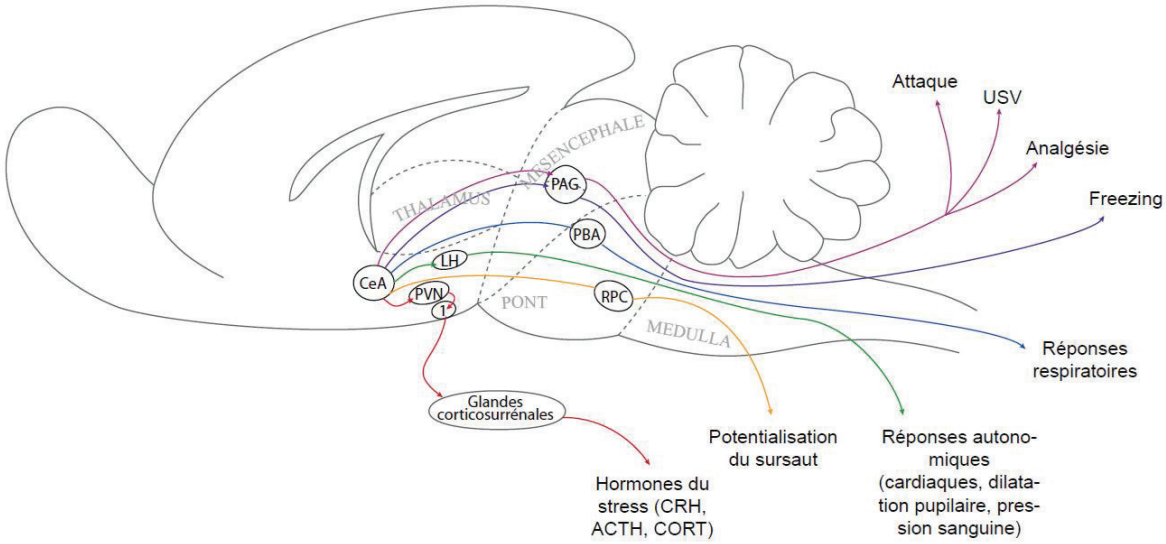


Figure 14 : *Schéma des principales structures impliquées dans les différents types de réponses de défense, en aval du noyau central de l'amygdale. 1 : hypophyse ou glande pituitaire ; CeA : amygdale centrale ; LH : hypothalamus latéral ; PAG : substance grise périaqueducale ; PBA : noyau parabrachial ; RPC : noyau caudal du pont réticulé. Schéma de synthèse réalisé par Julie Boulanger Bertolus dans son manuscrit de thèse (2016).*

De façon très schématique, les différents types de réponses de défense sont initiés suite à l'activation du noyau central de l'amygdale (voir la présentation des différents noyaux de l'amygdale au chapitre 2) et sont sous-tendus par différents noyaux du tronc cérébral comme par exemple la substance grise périaqueducale pour le freezing et les vocalisations ultrasoniques ou le noyau parabrachial pour les réponses respiratoires (Figure 14).

c. Les manifestations physiologiques de la peur

Tous ces comportements de peur exprimés par l'animal face à une menace sont accompagnés de changements physiologiques qui permettent à son organisme d'appréhender le danger (pour revue, voir De Kloet et al, 2005).

La mobilisation de l'organisme en réponse à un stress a son point de départ dans l'hypothalamus et comprend une action immédiate, neurovégétative et une action retardée, endocrinienne, via l'hypophyse (Figure 15). Dans un premier temps, l'hypothalamus active le système nerveux autonome sympathique qui stimule les glandes médullosurrénales et déclenche la libération d'adrénaline et de noradrénaline dans la circulation sanguine. Dans un second temps, l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (plus connu sous le terme d'Axe du stress) s'active : l'hypothalamus secrète une hormone, la CRH (Corticotropin Releasing

Hormone) qui agit sur l'hypophyse, laquelle libère à son tour l'ACTH (ou hormone corticotrope) et induit la libération de glucocorticoïdes (cortisol, cortisone) dans la circulation sanguine.

La libération de ces hormones de stress a plusieurs conséquences au niveau périphérique :

- Augmentation de la fréquence cardiaque et de la tension artérielle
- Augmentation de la fréquence respiratoire
- Moindre sensibilité à la douleur (analgésie)
- Augmentation du tonus musculaire

L'ensemble de ces effets permet à l'animal de produire la réponse comportementale la plus adaptée.

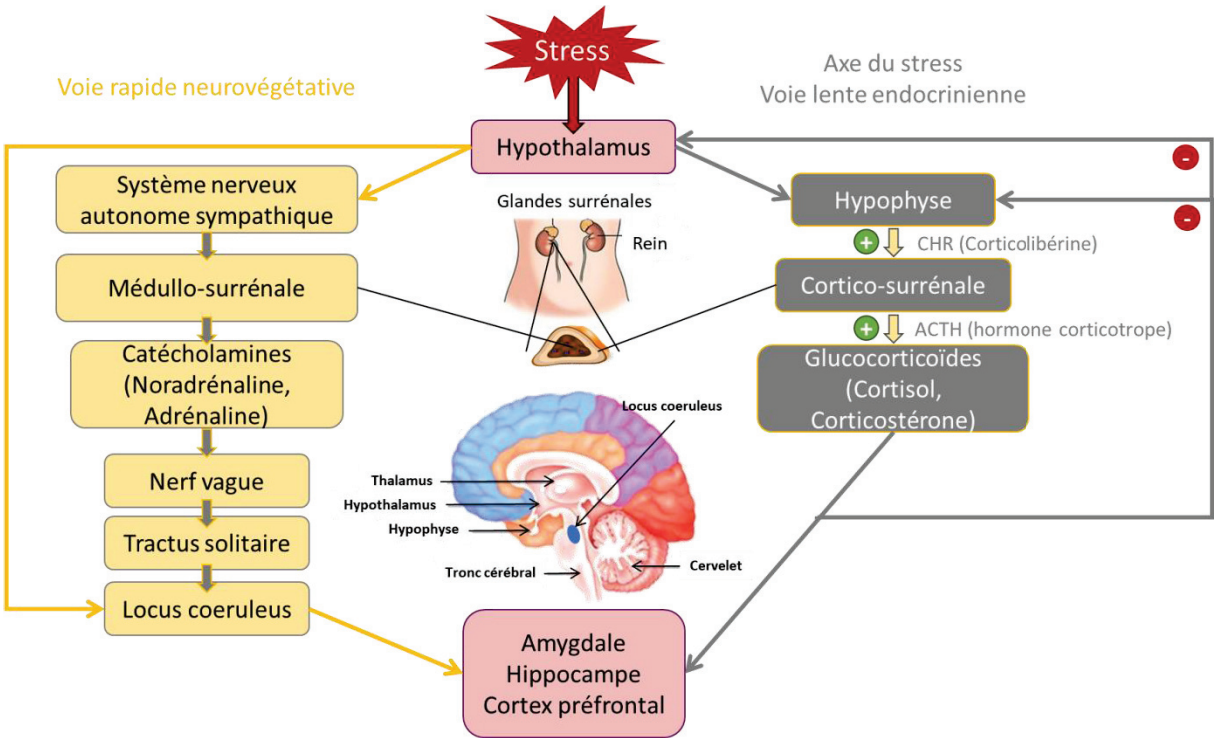


Figure 15 : *Les effets du stress sur l'organisme. Sur la gauche, la voie rapide neurovégétative qui conduit à l'activation du système noradrénergique. Sur la droite, la voie lente endocrinienne (appelée axe du stress), qui induit la production de cortisol. L'organisme peut réduire et ramener à une valeur basale les concentrations de cortisol par des boucles de rétrocontrôle négatif (adaptée de Maheu et Lupien (2003)).*

Par ailleurs, les glucocorticoïdes libérés dans la circulation sanguine sont capables de franchir la barrière hémato-encéphalique et peuvent ainsi agir sur des récepteurs dédiés présents dans différentes régions cérébrales, telles que l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal. La noradrénaline périphérique quant à elle ne passe pas la barrière hémato-encéphalique. Cependant en présence d'un stress, l'hypothalamus stimule le locus coeruleus induisant ainsi une augmentation de noradrénaline dans les structures cibles incluant l'amygdale et l'hippocampe. Ainsi, les hormones libérées en réponse à un stress peuvent par leur action sur le cerveau, moduler la mémoire de l'évènement stressant. Cette observation a

conduit à un nombre considérable d'études sur le rôle du stress sur la mémoire (pour revue voir Schwabe et al, 2012).

3. Mémoire émotionnelle et conditionnement de peur

Un des exemples les plus connus de la neuropsychologie pour illustrer la mémoire émotionnelle chez l'Homme est celui de petit Albert (Watson et Rayner, 1920) (Figure 16). Albert est un petit garçon âgé de 11 mois, très curieux. On lui donne alors une peluche en forme de rat blanc qu'il va manipuler, découvrir, etc… et qui ne l'effraie pas. Par la suite, à chaque fois que la peluche était présentée au petit garçon, les expérimentateurs frappaient un marteau contre une barre de fer près de la tête d'Albert ce qui le faisait sursauter et pleurer. Il s'agit là d'une réponse de peur innée, inconditionnée, face à un bruit soudain et intense. Après un certain nombre d'associations, le simple fait d'approcher la peluche près de l'enfant le faisait pleurer : il s'agit alors d'une réponse de peur conditionnée. La réponse de peur initialement induite par le bruit violent a été transférée à la peluche dont la valence émotionnelle a été modifiée par l'apprentissage.

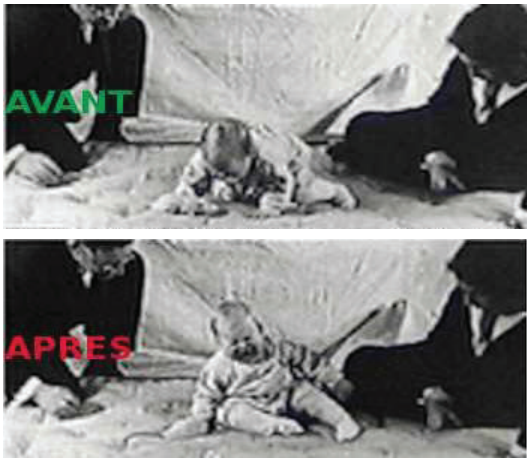


Figure 16 : *Photographies de l'expérience sur le petit Albert.*

Ce type d'expérience a été reproduit chez l'animal en laboratoire, et est désigné sous le terme de conditionnement pavlovien de peur. Dans cet apprentissage, un stimulus nouveau, de valence neutre, est envoyé à l'animal (souvent un son) suivi après quelques secondes d'un choc électrique léger à ses pattes. En quelques essais seulement, l'animal apprend que le stimulus initialement neutre prédit l'arrivée du choc électrique et va exprimer une réponse de peur face à ce stimulus (freezing, modification du rythme respiratoire…). Il y a eu un transfert de la valence négative du stimulus électrique vers le stimulus sonore. Le conditionnement de peur fait l'objet d'un intérêt croissant depuis plusieurs années car il est à l'interface entre mémoire et émotion (LeDoux, 2000). De plus, des perturbations dans le conditionnement de peur peuvent contribuer à des troubles de la peur et de l'anxiété chez l'Homme (trouble panique, phobies etc…) (Rosen et Schulkin, 1998 ; Wolpe, 1981).

Le conditionnement pavlovien en général (aversif, appétitif, etc…) implique l'apprentissage des relations hiérarchiques entre les événements (Rescorla, 1988) et permet donc aux organismes de former des représentations du monde dans lequel ils évoluent. Par conséquent, dans le cas du conditionnement pavlovien de peur, c'est la représentation des relations entre les événements aversifs et les stimuli qui les prédisent, qui est au cœur de cet apprentissage.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressées plus particulièrement au conditionnement de peur à l'odeur qui est beaucoup moins étudié dans la littérature de la mémoire que le conditionnement de peur au son. Or le rat est un animal macrosmate, c'est-à-dire qu'il se sert essentiellement de son odorat pour explorer son environnement. Et le système olfactif, chez le rat comme chez l'homme, présente des liens très privilégiés avec les structures impliquées dans la mémoire et les émotions, ainsi que nous allons le voir dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 2 : Le conditionnement de peur à l'odeur

Illustration représentant le chien de Pavlov, réalisée par Ktaiwanita, affichée dans le métro à l'arrêt Pavlova à Prague.

I. Du nez au cerveau : Perception et traitement du stimulus olfactif

« Il y a je ne sais quoi dans les parfums, qui réveille puissamment le souvenir du passé. […] L'odeur d'une violette rend à l'âme les jouissances de plusieurs printemps. »

Ramond De Carbonnieres, *Observations faites dans les Pyrénées pour servir de suite à des observations sur les Alpes.*

Sens primordial chez les animaux, l'odorat est le système sensoriel le plus primitif. Il est essentiel pour l'identification de nourriture, l'évitement de prédateurs (Takahashi et al., 2005; Arakawa et al., 2008), la recherche de partenaires sexuels (Keverne, 2004), les relations mère-jeune (pour revue, voir Corona et Lévy, 2015) et l'ensemble des interactions sociales (Brennan et Kendrick, 2006). Chez le rat, l'olfaction est fonctionnelle dès la naissance contrairement par exemple aux modalités visuelles ou auditives dont la maturation est plus tardive *(Moye et Rudy, 1985; Martin et Alberts, 1982).*

Le système olfactif comprend deux sous-systèmes: le système olfactif principal et le système olfactif accessoire. Pour chacun de ces deux systèmes, l'organisation structurale est similaire. On trouve au niveau de la cavité nasale des organes sensoriels : la muqueuse olfactive composée en partie de neurones sensoriels olfactifs exprimant des récepteurs olfactifs pour le système olfactif principal et l'organe vomeronasal composé en partie de neurones sensoriels vomeronasaux pour le système olfactif accessoire (Rodriguez, 2004). Ces organes sensoriels sont connectés à des structures centrales distinctes qui assurent le traitement de l'information : le bulbe olfactif principal (BO) pour le premier et le bulbe olfactif accessoire pour le second (Figure 17).

Alors que le système olfactif principal détecte les composés odorants volatiles, le système olfactif accessoire détecte les composés odorants non volatiles comme par exemple les phéromones (Mori, 1987).

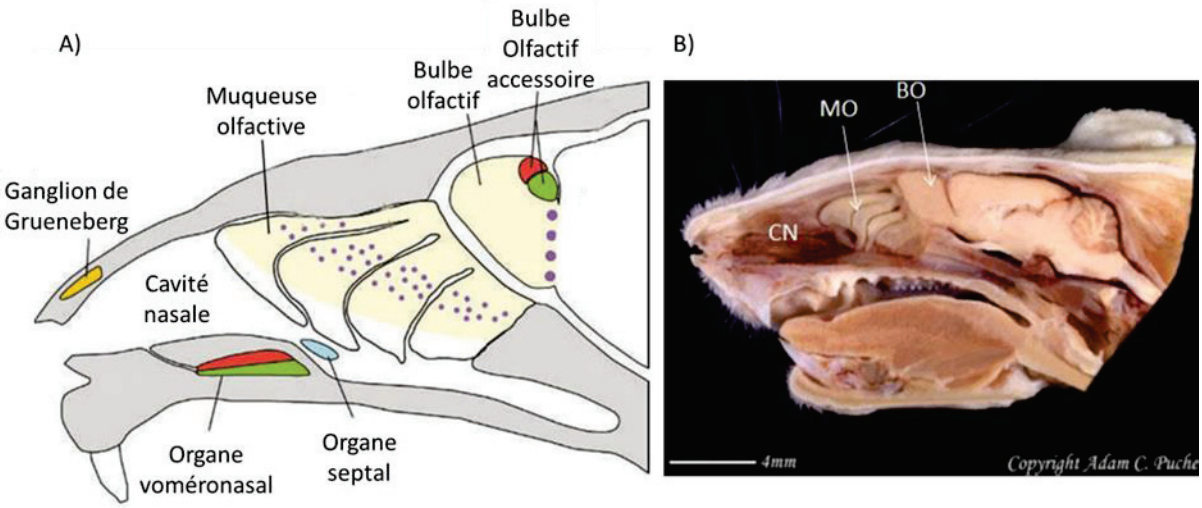


Figure 17 : *A) Organisation générale du système olfactif du rat, coupe sagittale (adapté de Brennan et Zufall, 2006). B) Photo d'une hémi-tête de rat en coupe sagittale mettant en évidence les 2 organes du système olfactif principal : muqueuse olfactive (MO) au fond de la cavité nasale (CN) et bulbe olfactif (BO).*

Dans le cadre de cette thèse, nous décrirons uniquement le système olfactif principal. Pour des raisons de simplification, la qualification de « principal » concernant le système olfactif et le bulbe olfactif sera donc omise dans la suite du manuscrit.

1. Qu'est-ce qu'une odeur ?

Le système olfactif principal est un système sensoriel spécialisé dans la détection et le traitement d'informations chimiques volatiles (Yeshurun et Sobel, 2010).

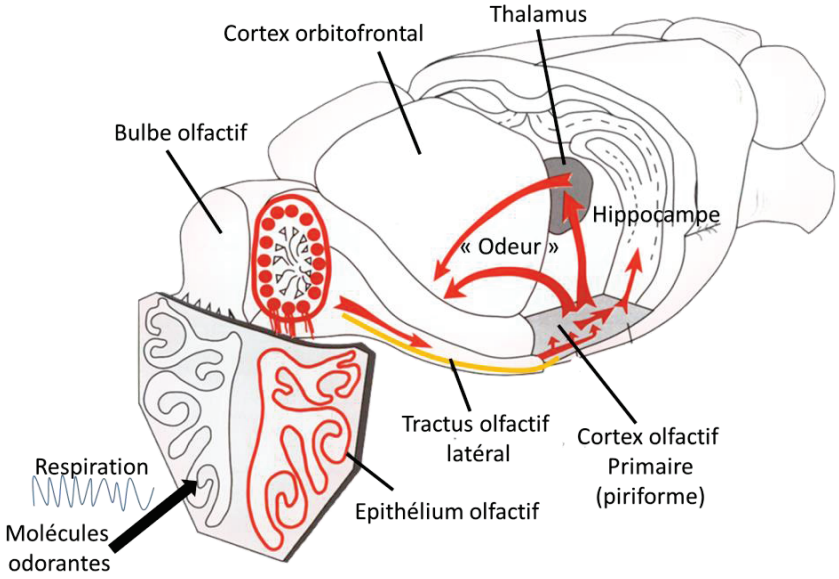


Figure 18 : *Trajet de l'information olfactive, depuis l'arrivée des molécules odorantes sur l'épithélium olfactif, transportées par la respiration, en passant par le bulbe olfactif qui rejoint le cortex olfactif primaire par le tractus olfactif latéral. L'information olfactive est alors transmise aux aires limbiques et aux centres supérieurs, aboutissant au percept olfactif : l'odeur.*

Quotidiennement, des milliers de molécules chimiques volatiles émanant de notre environnement, les odorants, viennent stimuler notre système olfactif. Ces odorants sont transportés par l'air et inhalés au rythme de notre respiration. Ils vont pénétrer dans le mucus de notre cavité nasale, là où baignent les cils des neurones chargés de les capturer au sein de l'épithélium olfactif. Un message électrique est alors envoyé au premier relai de projection des neurones olfactifs, le bulbe olfactif, puis vers le cortex olfactif primaire et les centres supérieurs, créant un percept olfactif : l'odeur (Figure 18).

Nous allons décrire rapidement chacun de ces trois étages successifs du traitement d'une molécule odorante.

2. L'épithélium olfactif principal

La respiration est essentielle à la perception d'une odeur. Avant de pouvoir être traitées, il faut que les molécules odorantes soient échantillonnées et transportées depuis l'environnement jusqu'à la cavité nasale par un flux d'air inspiratoire. Ce flux d'air peut être modulé de façon volontaire chez l'Homme, comme chez les animaux, pour faciliter l'échantillonnage des odorants. Chez l'Homme, cela se traduit essentiellement par une augmentation de l'amplitude et du débit du cycle respiratoire, sans changement notable de la fréquence. Chez le Rongeur, l'échantillonnage d'une odeur induit une augmentation du débit et de la fréquence respiratoire : c'est ce que l'on désigne par le terme de flairage.

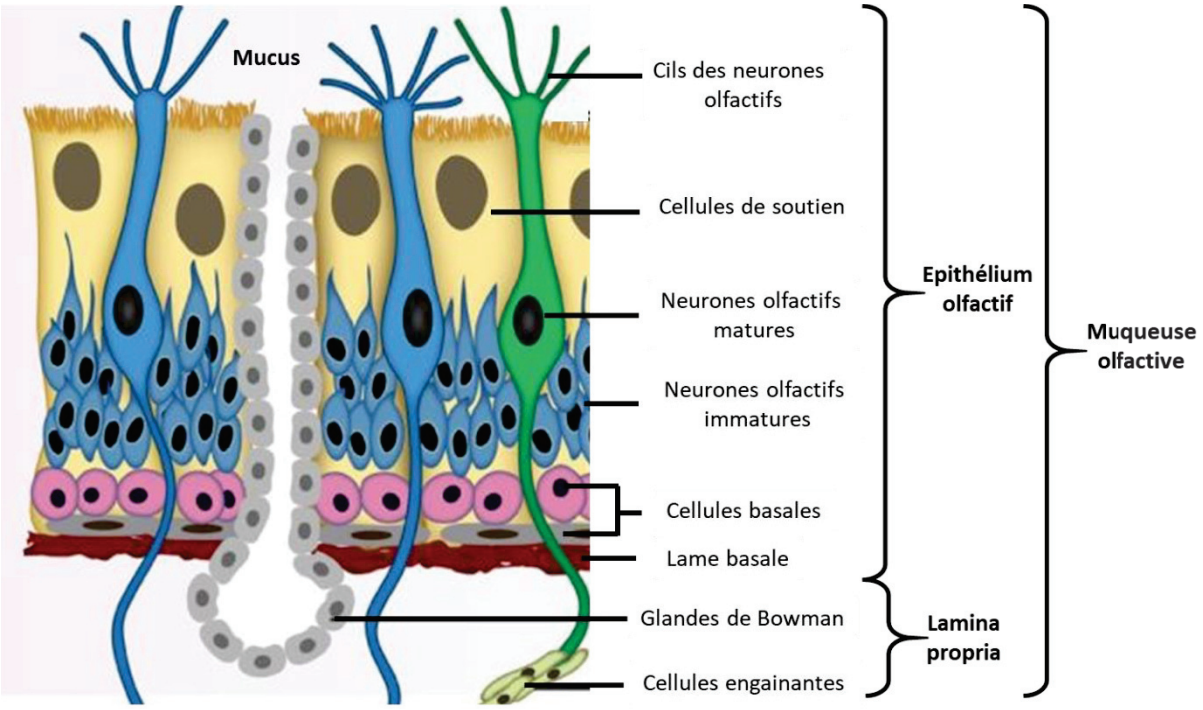


Figure 19 : *Organisation de la muqueuse olfactive du rongeur (adaptée de Palouzier-Paulignan et al, 2012)*

A chaque inspiration, c'est alors une synergie de molécules odorantes qui pénètrent dans notre cavité nasale et atteignent l'épithélium olfactif, qui est composé de trois types de

cellules différentes : les cellules de soutien, les neurorécepteurs olfactifs et les cellules basales (Figure 19). Grosmaitre et al. (2007) ont montré que les neurorécepteurs olfactifs pouvaient détecter à la fois des stimuli chimiques (une molécule odorante) mais aussi mécaniques (dû au flux d'air dans la cavité nasale). La mécanosensibilité de ces neurorécepteurs olfactifs permettrait notamment de synchroniser l'activité rythmique dans le bulbe olfactif avec la respiration (Nous reviendrons plus en détail sur ce point dans le chapitre 3).

Recouvrant cet épithélium se trouve une couche protectrice hydrophobe, le mucus. Si les molécules odorantes sont solubles dans le mucus, elles le traversent facilement. En revanche, si elles ne le sont pas, des protéines spécifiques présentes dans le mucus, les OBP (Odorant Binding Protein) vont les prendre en charge (pour revue : Tegoni et al., 2000).

Après avoir traversé le mucus, la molécule odorante vient se fixer sur un récepteur situé sur les cils du neurorécepteur olfactif. La super famille de gènes codant pour ces protéines réceptrices aux odorants a été identifiée par Buck et Axel en 1991, et on compte aujourd'hui chez le rat plus d'un millier de ces protéines. Sur chaque neurorécepteur olfactif se trouve un seul type de protéines réceptrices aux odorants, ce qui confère au système olfactif une grande spécificité (Buck et Axel, 1991). De plus, une même molécule odorante peut activer plusieurs récepteurs (Duchamp-Viret et al. 1999 ; Malnic et al., 1999).

Chaque odorant active une combinaison spécifique de récepteurs et déclenche une cascade de réactions moléculaires entrainant un potentiel d'action qui va se propager le long de l'axone des neurorécepteurs olfactifs jusqu'au premier relai : le bulbe olfactif. Le signal chimique est alors devenu un signal électrique.

3. Le bulbe olfactif

Les axones des neurorécepteurs olfactifs de l'épithélium olfactif forment des fascicules appelés nerfs olfactifs. Ces nerfs olfactifs se projettent sur le bulbe olfactif en passant par la lame criblée de l'os éthmoïde (os séparant la cavité nasale du cerveau).

Le bulbe olfactif est une structure laminaire concentrique au sein de laquelle s'individualisent six couches de cellules et de fibres distinctes (Figure 20). Le bulbe olfactif est le premier relai nerveux de l'information olfactive en provenance de la périphérie.

Les nerfs olfactifs font synapse au niveau des glomérules. Tous les neurorécepteurs olfactifs qui expriment les mêmes protéines réceptrices aux odorants convergent sur un même (ou quelques) glomérule(s) (Ressler et al, 1994 ; Buonviso al, 1991) et chaque glomérule reçoit des projections d'environ 20000 récepteurs (Revue : Mori 1995).

On retrouve alors dans le bulbe olfactif, pour chaque molécule odorante inhalée, une carte d'activation glomérulaire précise, symétrique entre les deux bulbes (pour revue voir Mori 1995, ou Murthy, 2011). Alors que la qualité des odorants module le pattern spatial

d'activation des glomérules, les modifications du flairage modulent le pattern temporel d'activation de ceux-ci (Buonviso et al., 2006) (voir chapitre 3).

Cette carte d'activation spatio-temporelle des glomérules est alors transmise au cortex olfactif primaire.

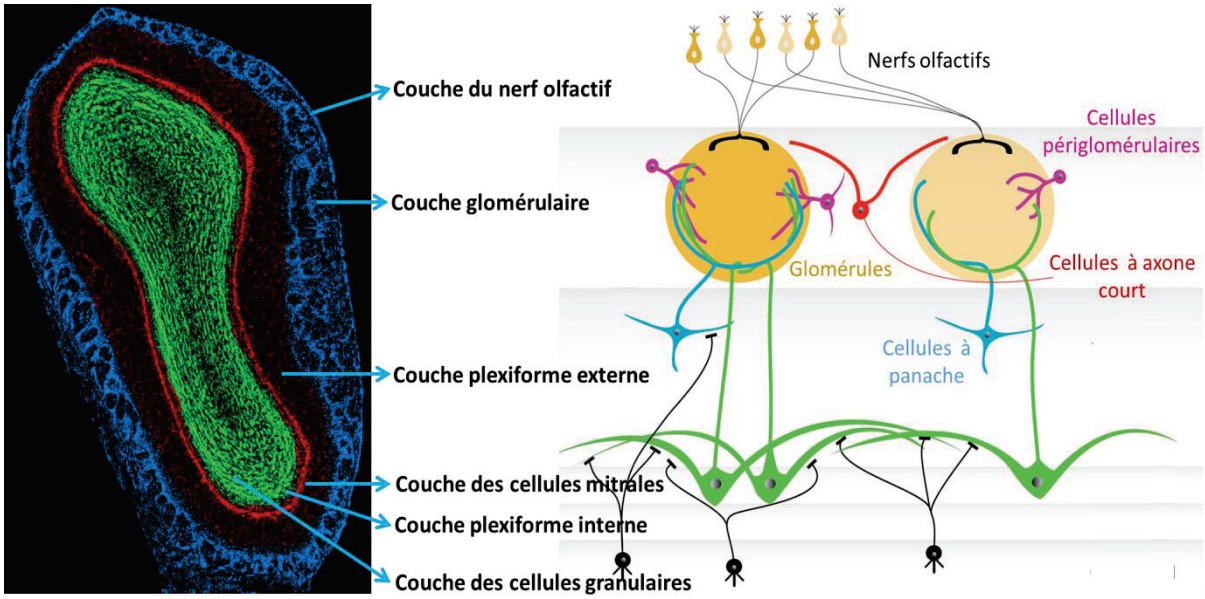


Figure 20 : *Organisation du bulbe olfactif du rongeur. Sur la gauche, image confocale d'une coupe frontale de Bulbe olfactif (adapté de Zou et al., 2009). Sur la droite, représentation schématique du réseau neuronal bulbaire (adapté de Nagayama et al, 2014).*

4. Le cortex olfactif primaire

Les axones des neurones de sortie du bulbe olfactif forment le tractus olfactif latéral qui se projette alors sur le cortex olfactif primaire. Celui-ci regroupe un ensemble de structures comprenant le noyau olfactif antérieur, le cortex piriforme, le tubercule olfactif, la tenia tecta ventrale, le noyau cortical antérieur de l'amygdale, le cortex périamygdalien, le cortex entorhinal latéral, le noyau endopiriforme et le noyau du tractus olfactif latéral (Luskin et Price, 1983; Carmichael et al., 1994; Shipley et Ennis, 1996; Haberly, 2001; Liebetanz et al., 2002).

Nous détaillerons ici uniquement le cortex piriforme, qui est la structure principale de projection du bulbe olfactif.

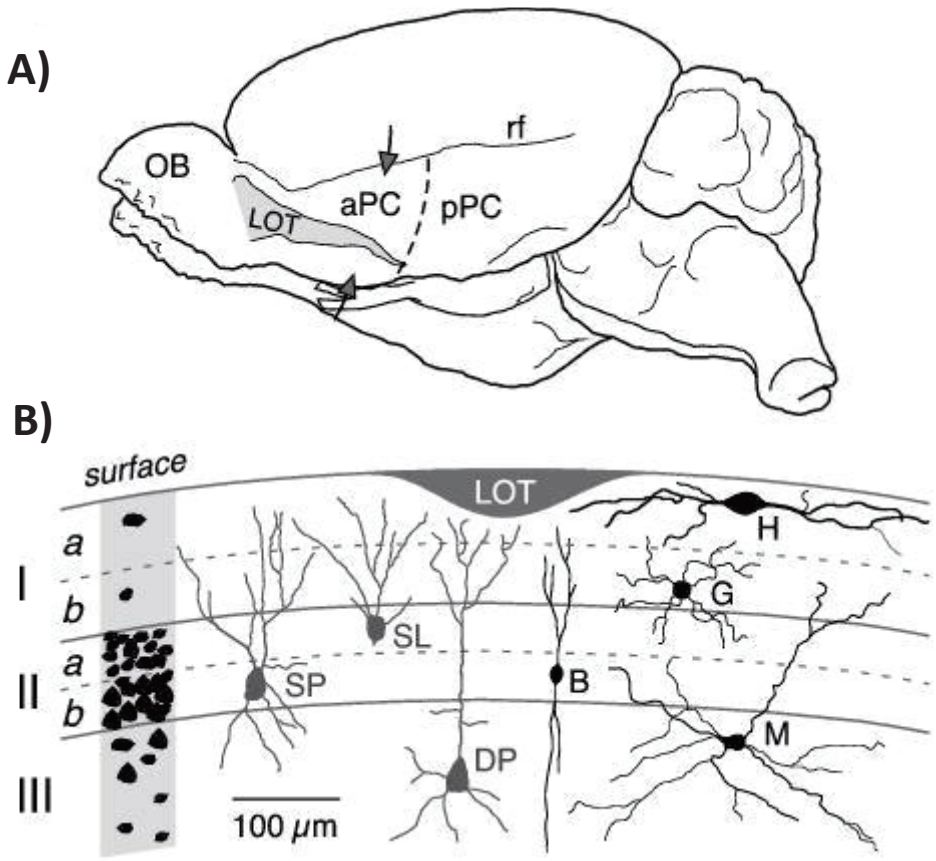


Figure 21 : *Organisation du cortex piriforme. A. Vue ventro-latérale d´un cerveau de rat. BO : bulbe olfactif ; LOT : tractus olfactif latéral ; aPC : cortex piriforme antérieur ; pPC : cortex piriforme postérieur ; rf : fissure rhinale. B) Les trois couches du cortex piriforme. (Suzuki et Bekkers, 2007).*

Le cortex piriforme est un paléocortex qui présente une organisation laminaire à trois couches (Haberly, 2001) (Figure 21). La couche I, la plus superficielle, contient les afférences du bulbe olfactif ainsi que des fibres associatives issues des cellules pyramidales et des interneurones inhibiteurs. La couche II regroupe les somas des cellules pyramidales superficielles et des cellules semi-lunaires et dans la couche III, la plus profonde, se trouvent les somas des cellules pyramidales profondes ainsi que des interneurones GABAergiques.

Mais le cortex piriforme n'est pas homogène en terme de quantité et de qualité d'afférences reçues du bulbe olfactif. C'est la partie antérieure du piriforme qui reçoit le plus d'afférences en provenance du bulbe olfactif (Haberly, 2001 ; Haberly et Price, 1978) tandis que la partie postérieure est préférentiellement connectée au reste du cerveau avec des projections sur un ensemble de structures comme l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus latéral, les ganglions de la base ou le néocortex. Cette dissociation anatomique s'accompagne également d'une dissociation fonctionnelle (Shepherd et Greer, 1990; Litaudon et al., 1997 ; Roesch et al, 2007). Alors que le cortex piriforme antérieur, fortement lié au bulbe olfactif, serait plus impliqué dans le traitement sensoriel du stimulus et dans les formes de mémoire

simples, la partie postérieure serait impliquée dans la mémoire associative et dans la représentation de la valence de l'odeur grâce à ses interactions avec l'amygdale notamment (Sevelinges et al, 2004 ; Litaudon et al, 1997 ; Mouly et al, 2001 ; Calu et al., 2007 ; Roesch et al., 2007 ; Barkai, 2014 ; Awad et al., 2015 ; Cohen et al., 2008 ; Terral et al., 2019 ; Wilson, 2003 ; Kadohisa et Wilson, 2006b).

5. Projections vers le système limbique et les centres supérieurs

Le système olfactif présente des caractéristiques particulières par rapport aux autres modalités sensorielles : en parallèle de sa projection directe sur le cortex piriforme, le bulbe olfactif se projette en peu de synapses sur deux structures clef de la mémoire et des émotions : l'amygdale et l'hippocampe. Concernant l'amygdale, le bulbe olfactif se projette massivement sur les noyaux corticaux de l'amygdale (McDonald, 1998). La modalité olfactive est la seule modalité sensorielle à avoir un accès direct à l'amygdale, sans passer par un relai thalamique comme c'est le cas pour la vision ou l'audition (McDonald, 1998; Swanson et Petrovich, 1998). Concernant l'hippocampe, le bulbe olfactif se projette d'abord sur le cortex entorhinal latéral qui se projette ensuite sur l'hippocampe (Haberly et Price, 1977 ; Witter et Amaral, 1991). Ainsi, les informations olfactives atteignent l'hippocampe en deux synapses. Ces particularités anatomiques font de l'olfaction une modalité sensorielle privilégiée pour l'étude de la mémoire, et en particulier pour la mémoire émotionnelle, comme l'attestent les études montrant que les souvenirs autobiographiques évoqués par les odeurs sont plus détaillés et émotionnels que ceux des autres modalités sensorielles (Hinton et Henley, 1993; Chu et Downes, 2002; Herz et al., 2004).

Le cortex piriforme se projette également sur les aires préfrontales, comme par exemple la partie infralimbique du cortex préfrontal médian, ainsi que dans les aires corticales insulaires orbitales et agranulaires de la région préfrontale ventrale (Krettek et al., 1977 ; Luskin et al., 1983 ; Datiche et Cattarelli, 1996) (Figure 22 pour une vue d'ensemble).

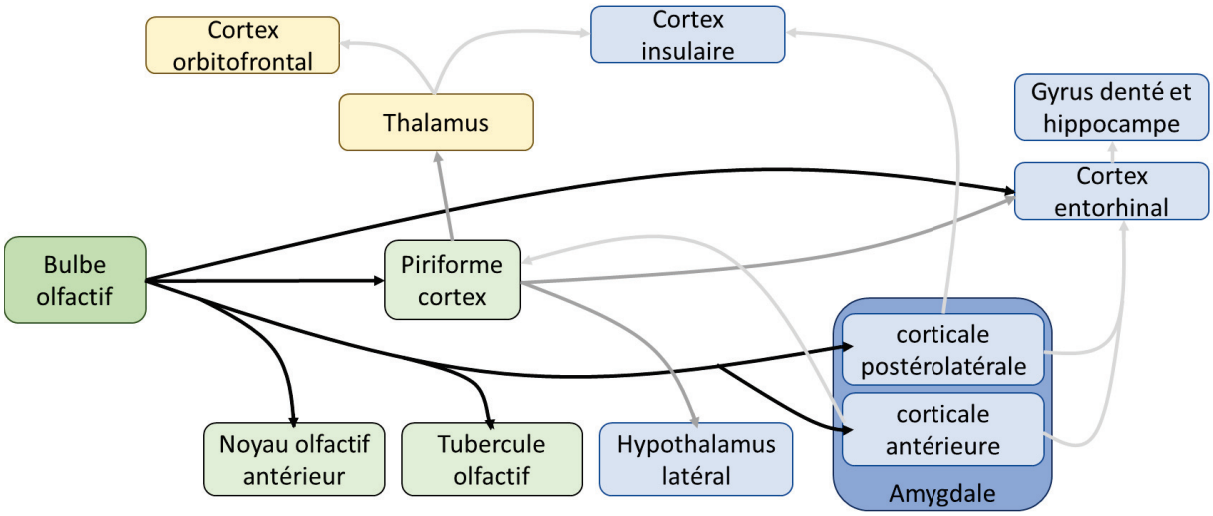


Figure 22 : *Schéma illustrant les principales connections du système olfactif principal (toutes les projections ne sont pas indiquées, les projections réciproques non plus par soucis de clarté) (adaptée de Brennan et Keverne, 1997).*

II. Neurobiologie du conditionnement de peur

De façon générale, les études réalisées sur le conditionnement de peur utilisent comme stimulus conditionnel un stimulus sonore. Nous détaillerons donc dans un premier temps les structures impliquées dans ce type de conditionnement de peur au son et nous préciserons ensuite l'ensemble des données complémentaires obtenues dans les quelques études portant sur le conditionnement de peur à l'odeur.

1. Le conditionnement de peur au son

a. Amygdale

Figure 23 : *Extrait d'une planche de l'album Astérix et les Normands décrivant le syndrome d'Urbach-Wiethe dont souffre la patiente S.M.*

Un cas clinique illustre bien le rôle capital de l'amygdale dans l'émotion de peur: la patiente SM, aussi appelée la « Femme sans peur ». Cette patiente souffre depuis l'enfance d'une maladie génétique rare appelée maladie d'Urbach-Wiethe (Figure 23) et présente une

lésion bilatérale complète et exclusive de l'amygdale bilatérale (Figure 24). Au cours d'une étude précédente, des scientifiques avaient montré que S.M. était incapable de reconnaitre la peur sur un visage. Feinstein et ses collaborateurs (2011) ont alors essayé de savoir si elle était quand même capable d'exprimer la peur (avec des réactions du type immobilité paralysante, fuite, réponse viscérale, …) en l'exposant à des situations apeurantes comme la confrontation avec des serpents et des araignées qu'elle dit détester. Alors que l'on pouvait s'attendre à ce que S.M. montre des signes caractéristiques d'une réaction de peur, il n'en fut rien, au contraire, elle exprima de la curiosité et de l'excitation à la vue des animaux et n'eut aucune appréhension à les manipuler. L'histoire raconte même qu'il a fallu la stopper dans son élan lorsqu'elle a voulu toucher une mygale. De plus, S.M. est capable d'apprendre des associations entre deux stimuli (par exemple un stimulus visuel avec un son soudain très intense), mais ne présente là encore aucun signe de peur quand on lui présente le stimulus visuel seul après apprentissage de l'association (Bechara et al., 1995).

Ce cas clinique a permis de confirmer ce qui avait été décrit auparavant dans le syndrome de Klüver-Bucy (en référence au psychologue Heinrich Klüver et au neurochirurgien Paul Bucy qui l'ont découvert dans les années 1930). Ce syndrome recouvre l'ensemble des anomalies observées chez un singe auquel on a retiré de façon bilatérale une partie des deux lobes temporaux, incluant l'amygdale. Parmi les nombreux symptômes, ceux imputés à l'amygdale sont la perte du comportement émotionnel avec placidité, voire apathie, ou encore là aussi une disparation de la peur.

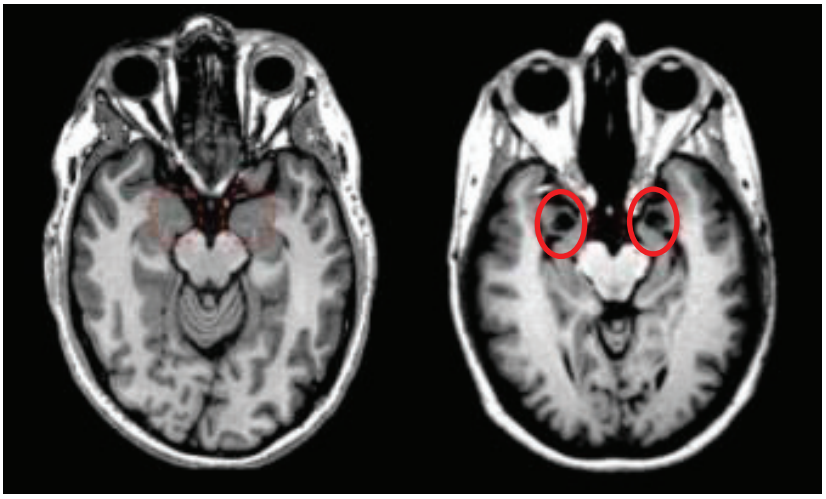


Figure 24 *: Image cérébrales de cerveaux en coupe transversale (vue de dessus). A gauche, un cerveau sain. A droite le cerveau de la patiente S.M., présentant deux lésions bilatérales au niveau des amygdales (en rouge). Crédit photo : Iowa Neurological Patient Registry /Université de Iowa.*

L'amygdale joue un rôle primordial dans l'acquisition, la rétention et l'expression d'une peur conditionnée (pour revue, voir LeDoux, 2000; Phelps et LeDoux, 2005; Maren, 2001). Elle est formée de plusieurs noyaux distincts anatomiquement (taille, forme, densité, …) et fonctionnellement, incluant principalement le noyau latéral, basolatéral, basomédial, et central (Brodal, 1947 ; Krettek et Price, 1978) (Figure 25). On distingue classiquement le complexe basolatéral (BLA) qui regroupe les noyaux latéral, basolatéral et basomédial et le

noyau central. La BLA, et plus particulièrement le noyau latéral, est le lieu de convergence d'un ensemble d'informations nociceptives et sensorielles, et donc notamment des informations concernant le stimulus conditionnel et inconditionnel et constitue donc la structure de prédilection pour former l'association entre ces deux stimuli.

Ainsi, des lésions sélectives de la BLA induisent de sévères déficits dans l'acquisition et le rappel de la peur conditionnée, et ceci indépendamment de la modalité sensorielle utilisée dans le conditionnement (Campeau & Davis, 1995b ; Cousens & Otto, 1998 ; LeDoux et al., 1990 ; Maren et al., 1996a). Des lésions transitoires réversibles de la BLA ont permis de montrer que cette implication avait lieu à la fois pendant l'acquisition, la consolidation, le rappel et la reconsolidation de la trace mnésique (Helmstetter et Bellgowan, 1994; Muller et al., 1997; Schafe et LeDoux, 2000; Goosens et Maren, 2001; Nader et al., 2001; Sacchetti et al., 1999; Doyère et al., 2007). Si l'on bloque la plasticité induite dans la BLA par le conditionnement par une injection d'antagoniste des récepteurs NMDA, on empêche l'apprentissage de l'association entre le stimulus conditionnel et inconditionnel (Miserendino et al. 1990; Campeau et al. 1992; Fanselow et Kim 1994). Cette plasticité servirait donc de support à la mémoire de l'association.

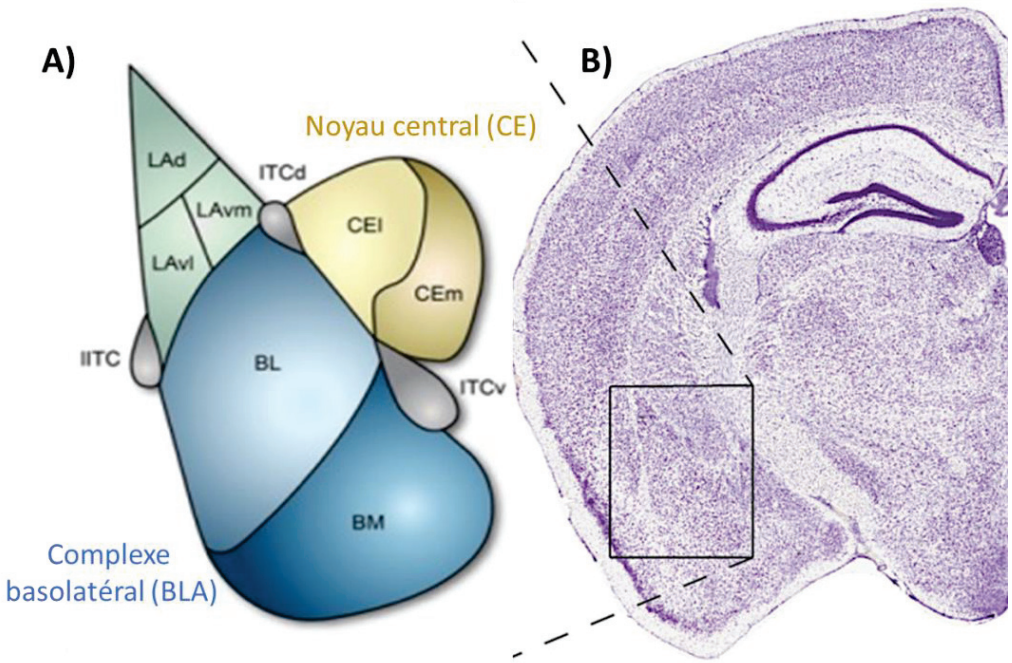


Figure 25 : *Organisation du complexe amygdalien du rongeur. A) En bleu le complexe basolatéral (BLA), en ocre le noyau central. LA : amygdale latérale ; BL : noyau basolatéral ; BM : noyau basomédian ; CEl : partie latérale du noyau central ; Cem : partie médiane du noyau central ; IITC : cellules intercalées latérales ; ITDd : cellules intercalées dorsales ; ITCv : cellules intercalées ventrales (adapté de Lee et al., 2013). B) Marquage au Nissl sur une coupe coronale (adaptée de Allen Mouse Brain Atlas; Keifer et al., 2015)*

Le noyau central de l'amygdale constitue l'interface amygdalienne avec les systèmes de réponse de peur et est impliqué dans l'expression de la peur conditionnée. Par exemple, la stimulation électrique de ce noyau induit des réponses comportementales semblables à celles

observées par les stimuli nociceptifs (Iwata et al., 1987 ; Kapp et al., 1982). Par ailleurs, des lésions du CE provoquent des déficits importants dans l'acquisition et l'expression de la peur conditionnée (Kim et Davis, 1993 ; Roozendaal et al., 1991 ; Goosens et Maren, 2001 ; Nader et al, 2001) qui seraient dus à des altérations de l'expression de la réponse de peur plutôt qu'à une perturbation de l'apprentissage de l'association (Fanselow et Kim, 1994 ; Goosens et al., 2000). Le noyau central serait donc impliqué dans l'expression de la mémoire de peur mais pas dans son stockage. Le noyau central envoie des projections vers différents noyaux du tronc cérébral qui sont impliqués dans le contrôle des différentes composantes de la réponse de peur (freezing, variations de la pression sanguine, des rythmes cardiaque et respiratoire, libération des hormones de stress…).

b. Hippocampe

Parmi les autres structures impliquées dans le conditionnement de peur, on retrouve l'hippocampe qui est préférentiellement impliqué dans la prise en compte du contexte dans lequel a lieu le conditionnement de peur. Chez les rats, la peur conditionnée au contexte est abolie lorsque l'hippocampe est lésé peu de temps après le conditionnement (1 jour après), alors que la peur conditionnée à un son reste intacte (Anagnostar et al., 1999 ; Kim et Fanselow, 1992 ; Maren et al., 1997). En revanche, si cette lésion survient longtemps après le conditionnement (28 jours), la peur conditionnée au contexte est conservée. Ces données suggèrent que l'hippocampe est impliqué, de façon transitoire, dans le stockage de la mémoire de peur au contexte. De la même manière, des lésions cette fois ci en amont du conditionnement empêchent l'acquisition de la mémoire de peur au contexte mais pas celle à un son (Phillips et LeDoux, 1992 ; Sanders et al., 2003).

L'ensemble de ces données confirment l'hypothèse que l'hippocampe encode une présentation du contexte, c'est-à-dire qu'il permet d'associer entre eux les nombreux stimuli qui composent l'environnement lors du conditionnement de peur (Fanselow,2000). Ceci est rendu possible par le fait que l'hippocampe reçoit des afférences sensorielles en provenance de différentes modalités : visuelles (Morris et al., 1982), olfactives (Eichenbaum et al. 1987), auditives (Edeline et al. 1988) et tactiles (Pereira et al. 2007). L'association multi sensorielle ainsi effectuée serait ensuite associée au choc au sein de la BLA (Fanselow, 1990; Goosens et Maren 2001).

c. Cortex préfrontal médian

Le cortex préfrontal médian (mPFC) est impliqué dans la régulation des mémoires de peur. En particulier, deux régions du mPFC ont été identifiées comment ayant des rôles distincts dans le circuit de la peur : le cortex prélimbique qui favoriserait l'expression de la peur, et le cortex infralimbique qui médirait la suppression de la peur et la rétention à long terme de l'extinction des mémoires de peur (pour revue voir Milad et Quirk, 2012). On peut noter que l'on retrouve également cette subdivision chez l'Homme, suggérant que les mécanismes neuronaux de l'apprentissage de l'extinction seraient conservés à travers les espèces (Milad

et Quirk, 2012). Le mPFC aurait donc un double rôle dans le contrôle de la peur, médié par le prélimbique et l'infralimbique.

Un circuit complexe impliquant l'amygdale, l'hippocampe et le mPFC est alors mis en jeu dans le conditionnement de peur au son. D'autres structures sont également impliquées, comme les cortex sensoriels, qui permettent de transmettre les informations sensorielles reçues à ce circuit, étape essentielle à l'apprentissage de l'association, sa rétention, son extinction et sa récupération.

d. Les cortex sensoriels

Selon LeDoux (1998), deux circuits parallèles seraient envisagés dans le conditionnement de peur au son : un circuit court et un long.

Le circuit court met en jeu des projections directes du thalamus sur l'amygdale. En empruntant ce circuit, le stimulus conditionné sonore serait traité très rapidement, mais de façon grossière. Le circuit long inclut le thalamus, qui envoie l'information vers le cortex sensoriel auditif. A ce niveau, la discrimination du stimulus conditionné auditif est affinée et cette information plus détaillée est envoyé vers l'amygdale.

Il est difficile d'étudier le rôle des cortex sensoriels dans le conditionnement peur car ils sont impliqués en premier lieu dans la transmission de l'information sensorielle, et leur lésion peut donc entraîner des déficits sensoriels qui se confondent avec d'éventuels déficits mnésiques. Cependant Saccho et Sachetti (2010) ont réalisé des lésions de cortex de différentes modalités sensorielles (auditif, visuel ou olfactif) et ont montré que ces cortex étaient impliqués dans le stockage à long-terme (mais pas à court terme) de la trace mnésique.

Ci-après est représenté un schéma bilan récapitulant les principales structures impliquées dans le conditionnement de peur au son chez le rat (Figure 26).

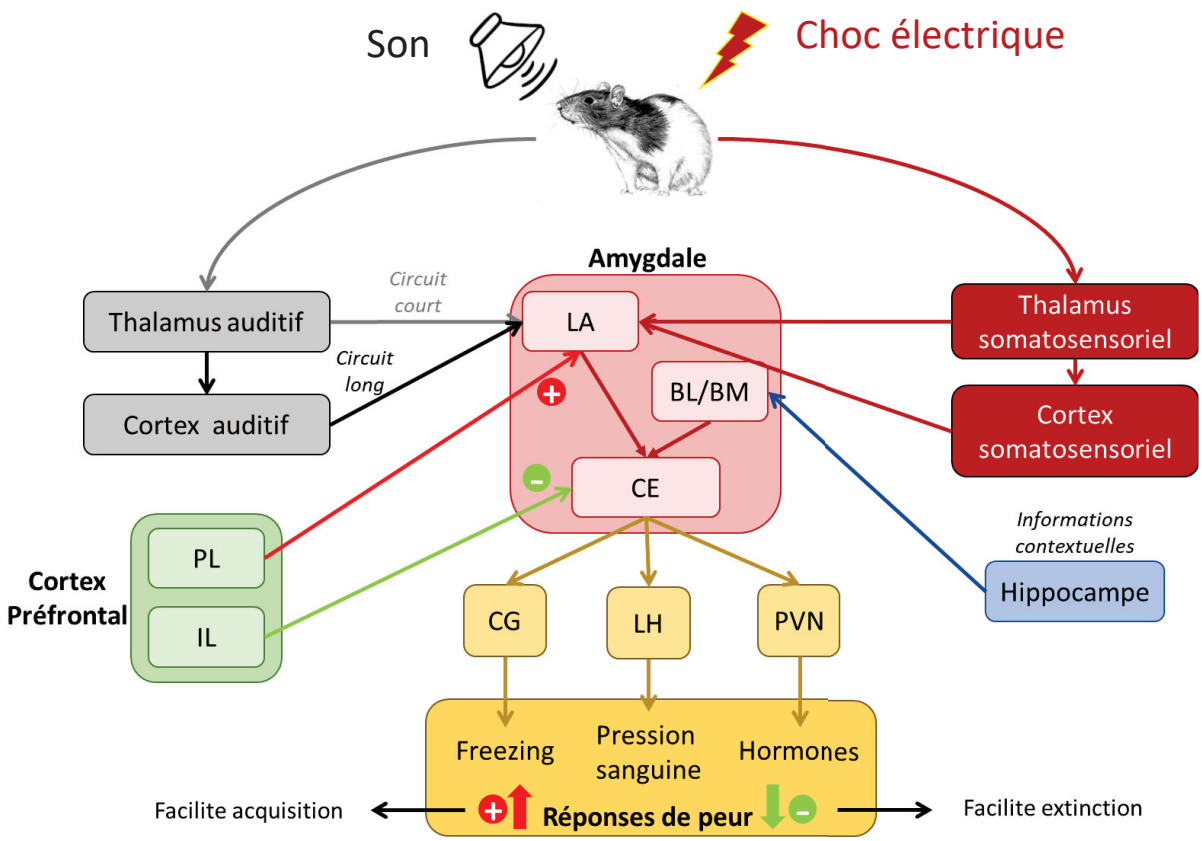


Figure 26 : *Réseau neuronal sous-tendant le conditionnement de peur au son. Le stimulus conditionnel neutre (le son) est présenté en association avec le stimulus inconditionnel aversif (le choc électrique). Les informations en provenance des thalamus et cortex auditifs et somatosensoriels convergent sur le noyau latéral de l'amygdale (LA). En parallèle, les informations contextuelles intégrées par l'hippocampe convergent sur l'amygdale basomédiane (BM). Ces informations sont transmises à l'amygdale centrale (CE) qui est la sortie motrice de l'amygdale et contrôle l'expression des réponses de peur comme le freezing ou les réactions liées au système nerveux autonome (tension artérielle, fréquence cardiaque...) et endocrinien (hormones). Le cortex préfrontal joue le rôle de régulateur des mémoires de peur en favorisant ou inhibant l'expression des réponses de peur. CG, central gray; LH, lateral hypothalamus; PVN, paraventricular hypothalamus. Adapté de Medina et al. (2002).*

2. Le conditionnement de peur à l'odeur

Bien qu'assez peu nombreuses, les études concernant les circuits du conditionnement de peur à l'odeur présentent à la fois des ressemblances et des particularités avec ceux impliqués dans le conditionnement de peur au son.

a. L'amygdale

L'amygdale joue également un rôle clé dans le conditionnement de peur à l'odeur.

Tout d'abord, des études en imagerie métabolique montrent que lors du conditionnement, on observe une augmentation de l'absorption de 2-Desoxyglucose

(marqueur global de l'activité d'une structure) dans le BLA (Sullivan et al., 2000a ; Moriceau et Sullivan, 2006 ; Raineki et al., 2009).

Ces observations ont été confirmées par des études lésionnelles qui ont mis en évidence l'implication de l'amygdale dans l'acquisition, la consolidation et la rétention de l'apprentissage de l'association odeur-choc. Par exemple, Cousens et Otto (1998) ont lésé la BLA avant le conditionnement, ce qui a empêché l'expression des comportements de défense lors de la présentation ultérieure de l'odeur conditionnée. De plus, si on bloque le fonctionnement de l'amygdale de façon transitoire en injectant de la tétrodotoxine (inhibiteur de la conduction nerveuse) juste après le conditionnement, les animaux présentent une diminution de l'expression de peur face au stimulus conditionnée présenté 48h après (Kilpatrick et Cahill, 2003), suggérant l'implication de l'amygdale dans les processus de consolidation mnésique

D'autres études ont également montré que le conditionnement de peur à l'odeur induisait une plasticité dans l'amygdale, notamment dans la BLA avec une augmentation de l'expression du gène précoce C-Fos (marqueur d'activation) (Funk et Amir, 2000). Jones et collaborateurs (2007) ont également observé une augmentation du gène BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) dans la BLA, qui est un gène tardif impliqué dans la réorganisation des synapses nécessaires à la plasticité neuronale. De plus, le conditionnement de peur à l'odeur est associé à des phénomènes de plasticité de la réponse des neurones de l'amygdale, tant au niveau unitaire (Rosenkranz et Grace, 2002 ; Motanis et al., 2012) qu'à l'échelle populationnelle (Sevelinges et al., 2004).

L'implication de l'amygdale dans le conditionnement de peur à l'odeur semble être médiée par la voie glutamatergique (via les récepteurs NMDA) (Walker et al., 2005). En effet, Hegoburu et collaborateurs ont constaté une augmentation transitoire de glutamate dans l'amygdale dès la première association odeur-choc (Hegoburu et al, 2009). Si l'on injecte une antagoniste des récepteurs NMDA dans le BLA juste avant la première association, l'apprentissage ne se fait pas. (Hegoburu et al., 2014).

b. Muqueuse et bulbe olfactif

Différentes études ont montré que le conditionnement de peur à l'odeur induisait des modifications dès les niveaux périphériques du système. Ainsi, Kaas et al (2013) utilisant une technique d'imagerie optique chez la souris, ont mis en évidence une facilitation de la réponse des neurorécepteurs olfactifs des suites de l'apprentissage. Jones et al. (2008) ont montré que le nombre de neurorécepteurs olfactifs et la taille des glomérules bulbaires sensibles à l'odeur apprise sont augmentés des suites d'un conditionnement de peur à l'odeur chez la souris. Ces observations ont été confirmées par Dias et Ressler (2014) qui dans une étude complémentaire ont montré que l'extinction de l'apprentissage initial s'accompagnait d'un retour à la normale de ces paramètres.

Concernant le bulbe olfactif, des travaux anciens du groupe de Walter Freeman (Bressler, 1988; Freeman et Schneider, 1982) ont montré chez le lapin que l'apprentissage olfactif aversif induisait des modifications des activités électrophysiologiques type EEG. Plus récemment, chez la souris anesthésiée, la technique d'imagerie calcique a permis de montrer que l'apprentissage aversif olfactif induisait une facilitation de la réponse dendritique des neurones excitateurs (Fletcher, 2012) et des interneurones inhibiteurs (Kass et McGann, 2017) du bulbe olfactif.

c. Cortex piriforme

Différents travaux ont mis en évidence le rôle du cortex piriforme dans le conditionnement de peur à l'odeur. Ainsi, Barnes et al. (2011) ont enregistré l'activité oscillatoires des neurones du cortex piriforme chez des rats soumis à un conditionnement de peur à l'odeur puis lors d'une phase de sommeil post-conditionnement. Ils ont constaté que la puissance de l'activité oscillatoire générée par la présentation de l'odeur conditionnée augmentait tout au long du conditionnement, ce qui n'est pas le cas chez un groupe de rat où seule l'odeur a été présentée sans association au choc électrique. Récemment, Meissner-Bernard et al. (2019) ont montré, par une technique de manipulation génétique de C-Fos (« Fos tagging »), que le conditionnement de peur à l'odeur activait un ensemble de neurones distribués dans le cortex piriforme chez la souris. Une inactivation de ces neurones altère la récupération de la mémoire de peur sans perturber les capacités sensorielles des animaux. A l'inverse, la réactivation de ces neurones diminue le comportement exploratoire de la souris, mimant ce que l'on observe lors du rappel de la mémoire de peur.

Comme nous l'avons déjà décrit au chapitre 2, le cortex piriforme n'est pas homogène en termes de quantité et de qualité d'afférences reçues du bulbe olfactif, ce qui lui confère des fonctions différentes. Ces différences se retrouvent dans le conditionnement de peur.

Ainsi, Sevelinges et al. (2004) ont mis en évidence une potentialisation du potentiel évoqué dans le cortex piriforme postérieur (mais pas dans la partie antérieure) 24 h après une séance de conditionnement de peur à l'odeur.

D'autres études utilisant la technique de marquage métabolique au 2-désoxyglucose arrivent à des résultats similaires : suite à un conditionnement de peur à l'odeur, une augmentation de marquage 2-désoxyglucose a été constatée dans le cortex piriforme postérieur mais pas dans le cortex piriforme antérieur (Moriceau et al., 2006; Raineki et al., 2009 ; Sevelinges et al., 2008).

Hegoburu et al. (2009) ont analysé les fluctuations de glutamate et de GABA dans le cortex piriforme postérieur au cours d'une session de conditionnement chez le rat. Ils ont observé une augmentation transitoire de glutamate après chacune des associations odeur-choc. Dans une étude complémentaire, les auteurs ont montré que l'injection d'un antagoniste des récepteurs NMDA (récepteurs activés par le glutamate et essentiels à la plasticité synaptique) dans cette structure avant le conditionnement induit une altération de la mémoire à long terme (mais pas à court terme) de l'association (Hegoburu et al., 2014).

Certains auteurs ont émis l'hypothèse que c'est dans le cortex piriforme postérieur que serait encodée la valence de l'odeur conditionnée (Sacco et Sacchetti, 2010; Hegoburu et al., 2014). Ceci permettrait une réponse précoce au stimulus, un peu comme le circuit court propose par LeDoux (1996) dans le cas d'un stimulus auditif, ou encore visuel (Pessoa et Adolphs, 2010).

d. Autres structures impliquées

D'autres structures semblent impliquées dans le conditionnement de peur à l'odeur. Notamment, le cortex périrhinal. En effet, sa lésion induit une diminution de la réponse de peur lorsque l'odeur conditionnée est présentée seule 24h après le conditionnement (Herzog et Otto, 1997). En revanche, cette lésion n'affecte pas un apprentissage de peur au son (Sacco et Saccheti, 2010), ni même au contexte (Herzog et Otto, 1997).

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

D'autre part, Parsons et Otto (2008) ont montré que par des lésions de l'hippocampe dorsal, que cette structure était spécifiquement recrutée dans un conditionnement de peur olfactif non contextuel.

Ainsi, le réseau impliqué dans le conditionnement de peur à l'odeur intègre des structures, dont certaines sont communes à celles de conditionnement de peur au son, qui fonctionnent en lien les unes avec les autres. L'objectif de mon travail de thèse était d'étudier le réseau impliqué à la fois dans l'expression des réponses de peur (étude 1), mais aussi dans l'encodage du temps (étude 2) dans le conditionnement de peur à l'odeur. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser une technique qui offre une bonne résolution temporelle, c'est la technique d'enregistrement électrophysiologique multisite des activités oscillatoires. Ces activités oscillatoires sont le reflet de la communication intra-structures mais également inter-structures. Nous allons les introduire dans ce troisième chapitre.

CHAPITRE 3 : Les oscillations cérébrales

"Right Brain" est une expérience scientifique/ visualisation artistique de données utilisant 10 secondes d'enregistrement EEG d'oscillations cérébrales (Alpha, Bêta, Gamma et Thêta) au cours de la méditation. La séquence a ensuite été transférée directement en mouvement de points dans l'espace 3D, chaque point représentant le pouvoir cumulatif de chaque échantillon des oscillations cérébrales enregistrées.

Pour voir la vidéo associée : https://www.ronentanchum.art/filter/video-art/RIGHT-BRIAN

Comme nous l'avons vu, l'acquisition, la rétention, l'extinction ou encore le rappel d'une mémoire de peur impliquent un ensemble de structures cérébrales et donc de populations neuronales. Mais jusqu'alors, nous n'avons pas abordé la notion de réseau. Comment ces structures, ces populations neuronales distribuées de façon plus ou moins distales dans le cerveau communiquent-elles pour permettre l'exécution des fonctions cognitives souhaitées ? Il faut pour cela des mécanismes de codage/communication suffisamment souples permettant de s'adapter à la complexité des tâches et fonctions cognitives tout en conservant une certaine robustesse, mais également adaptés à la dynamique temporelle de transfert des informations par les influx nerveux. De nombreux auteurs ont émis l'hypothèse que l'intégration des sous-ensembles neuronaux en une assemblée cohérente est déterminée par des périodes transitoires de synchronisation temporelle fine de l'activité des neurones (voir Singer et Gray, 1995 ; Bressler et Kelso, 2001 ; Varela et al., 2001). Cette assemblée de neurones synchronisés serait alors dans une configuration optimale pour permettre l'échange d'informations. L'étude de ces activités de populations neuronales par différentes techniques a permis de mettre en évidence leur caractère oscillatoire : on parle alors d'oscillations cérébrales.

« It is necessary to study not only parts and processes in isolation, but also to solve the decisive problems found in the organization and order unifying them, resulting from dynamic interaction of parts, and making the behavior of parts different when studied in isolation or within the whole. »

Ludwig von Bertalanffy (1901-1912), Chapitre 2, *General System Theory.*

I. Quelques généralités

1. Découverte et description/caractérisation des oscillations

Les oscillations cérébrales sont l'un des phénomènes les plus conservés dans l'évolution des mammifères et sont présentes dans l'ensemble du règne animal, des centres nerveux des mollusques constitués de seulement quelques neurones globulaires compactés, jusqu'au cerveau humain contenant une centaine de milliards de neurones. Ces ondes cérébrales sont omniprésentes dans le cerveau et les réseaux de neurones sont actifs de manière permanente que ce soit chez les invertébrés comme dans le cerveau humain. Seule exception connue à ce jour, la pieuvre *Octopus vulgaris,* dont l'activité électrique cérébrale est similaire à celle des vertébrés, est le seul animal chez qui les ondes cérébrales présentent des interruptions transitoires inexplicables : pendant plusieurs minutes, l'activité cérébrale cesse.

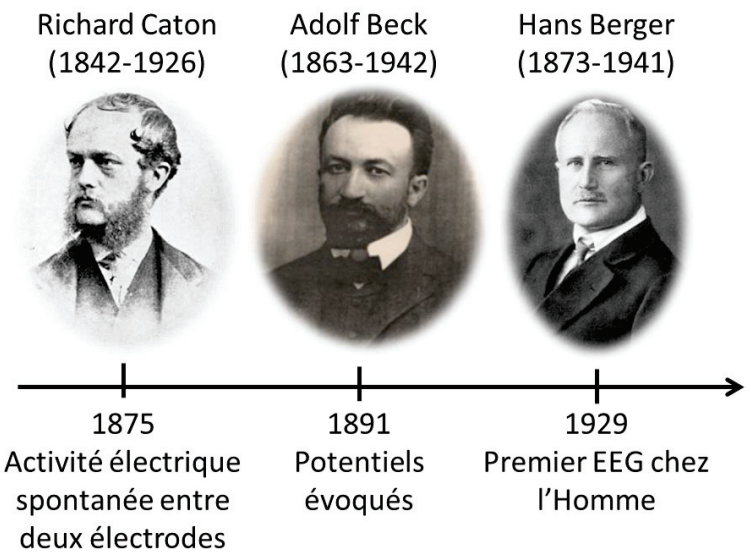


Figure 27 : *Chronologie de la découverte des oscillations.*

On attribue souvent la description/découverte de ces ondes cérébrales chez l'Homme au psychiatre allemand Hans Berger (1929), qui inventa le terme électroencéphalogramme (EEG) pour qualifier les décharges électriques enregistrées à la surface et dans la profondeur du cerveau. Toutefois, c'est bien un demi-siècle plut tôt, en 1875, que Richard Caton découvre chez le lapin et le singe une activité électrique oscillatoire spontanée entre deux électrodes placées à la surface du cortex cérébral, activité qui était modulée par des stimuli sensoriels. La description de ses enregistrements tenait en 9 phrases, dont la cinquième était la suivante :

« Feeble currents of varying direction pass through the multiplier when the electrodes are placed on two points of the external surface, or one electrode on the gray matter, and one on the surface of the skull. »

Richard Caton, 1875.

Quelques temps après, en 1891, Adolf Beck ajouta également sa contribution au développement des connaissances des oscillations en publiant ces découvertes concernant entre autre les fluctuations électriques spontanées, les potentiels évoqués (= modification de l'activité électrique du système nerveux en réponse à une stimulation sensorielle extérieure) ainsi que la désynchronisation des ondes cérébrales.

Mais pourquoi tout cet engouement autour des oscillations cérébrales ? Comme nous l'avons rapidement décrit, les oscillations cérébrales sont le reflet de l'activité synchrone d'une assemblée de neurones. Il est aujourd'hui largement admis que la synchronisation des populations neuronales joue un rôle important dans l'intégration sensorielle et la cognition (Engel et al., 2001; Tallon-baudry et al., 2001; Varela et al., 2001). En effet, cette synchronisation favoriserait le transfert d'information entre des groupes de neurones d'une même structure ou de plusieurs structures impliquées dans un même processus (Fries, 2005, 2015) (Figure 28).

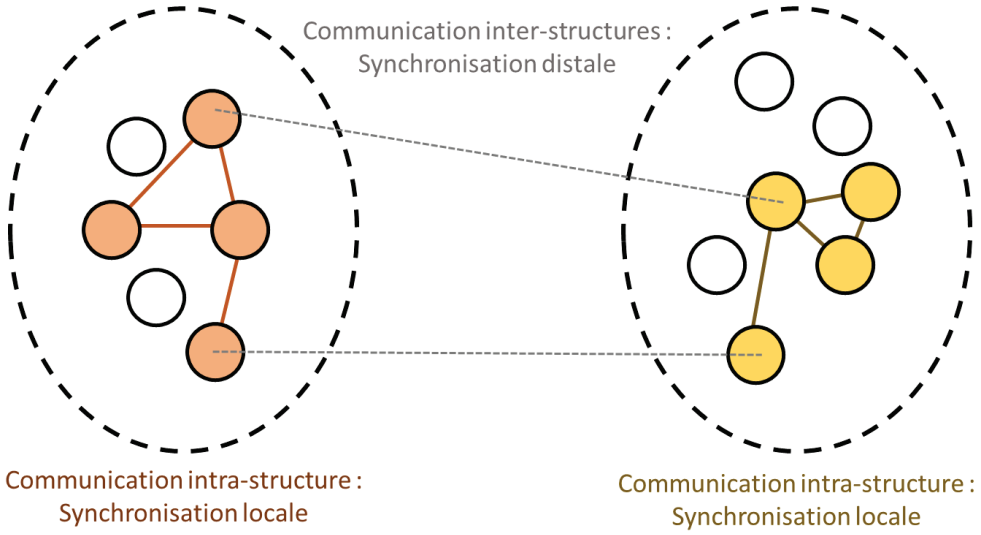


Figure 28 : *Synchronisation locale et distale des populations neuronales (adaptée de Varela et al., 2001).*

« Cells that fire together, wire together »
Donald Hebb (Portrait 9), 1949

Portrait 9 : *Donald Hebb (1904-1985)*

Selon le principe de Hebb, l'activation simultanée de plusieurs neurones faciliterait la transmission d'information entre eux, ce qui permettrait le renforcement de leurs contacts synaptiques et donc la création de circuits de mémoire. Cela se comprend facilement : si l'activité des neurones convergeant sur une même synapse est synchrone, la probabilité de déclencher un potentiel post-synaptique, et donc de conduire à des processus de plasticité synaptique, est plus importante (Salinas et Sejnowski, 2001). A l'inverse, si les décharges neuronales sont désynchronisées, il y a moins de chance qu'un potentiel post-synaptique soit déclenché, et donc que les connexions synaptiques soient modifiées. On constate alors ici les enjeux de la synchronisation des activités neuronales. On peut d'ailleurs noter que des perturbations des activités oscillatoires cérébrales ont été associées à différents troubles mentaux comme la schizophrénie et la maladie de Parkinson (Schnitzler et Gross, 2005).

On classe communément les oscillations en fonction de leur fréquence, qui varie dans une très large gamme (1-120Hz). Si l'on imagine ces ondes comme des notes de musique, les ondes basses fréquences ressembleraient à un tambour très pénétrant/englobant et chaud, alors que les ondes hautes fréquence ressembleraient davantage à une flûte aigue et lancinante. A l'image d'une symphonie, les fréquences hautes et les fréquences basses se lient les unes aux autres par des harmoniques. A l'heure actuelle, différentes bandes de fréquence sont décrites dans la littérature même si la communauté scientifique ne s'accorde pas encore parfaitement sur la définition de ces bandes qui varie selon la région du cerveau concerné,

l'espèce et même la tâche comportementale effectuée. On doit d'ailleurs la nomenclature utilisée pour définir ces diférentes bandes de fréquence à Hans Berger. Nous présenterons ici le découpage fréquentiel majoritairement utilisé dans les études chez le rongeur, et les différents états cognitifs et comportementaux dans lesquels les différentes fréquences ont été observées (Engel et al., 2001; Tallon-baudry et Bertrand, 1999). De façon générale, il a été proposé que les fréquences oscillatoires rapides/hautes jouent un rôle dans le traitement de l'information à une échelle locale, alors que les fréquences oscillatoires lentes/basses seraient particulièrement adaptées pour la communication à longue portée entre des structures éloignées (Gloveli et al., 2005).

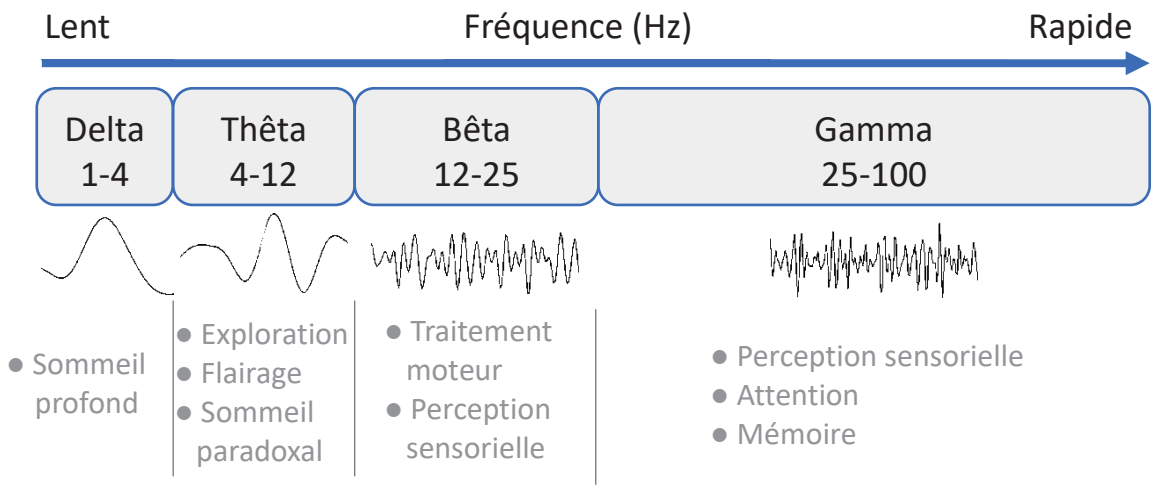


Figure 29: *Classification des oscillations chez le rongeur.*

De façon très schématique (Figure 29), les oscillations de basse fréquence delta (0.5-4 Hz) sont associées aux phases de sommeil profond. Les ondes thêta (4-12 Hz) sont observées principalement dans les structures limbiques (en particulier l'hippocampe) lors de comportements d'exploration incluant le flairage et les mouvements des vibrisses (Vanderwolf, 1969 ; Buszaki, 2002) ainsi que pendant le sommeil paradoxal. Les oscillations de haute fréquence bêta (15-30 Hz) et gamma (30-100 Hz) sont spécifiques de l'état d'éveil et sont corrélées à des niveaux attentionnels élevés (pour revue voir Uhlhaas et al., 2008). Par exemple, les oscillations bêta présentes au niveau des régions frontales s'observent en période d'éveil actif ou lors d'un état de concentration intense ou d'un état émotionnel exagéré, et les oscillations gamma sont impliquées dans les phénomènes d'attention et de liage perceptif (e.g., représentation des objets; Tallon-Baudry et Bertrand, 1999). Ces oscillations gamma, de par leur dynamique temporelle rapide permettent de coordonner de façon précise la réponse unitaire au sein même d'une structure, mais également entre les structures (Buzsáki et Wang, 2012; Lisman et Jensen, 2013).

Une propriété importante des oscillations lentes est qu'elles sont capables d'organiser les rythmes rapides (Heck et al., 2017; Tort et al., 2018). Les interactions entre ces différents oscillateurs sont souvent hiérarchiques. En effet la phase des oscillations lentes module la puissance des oscillations rapides, c'est ce que l'on appelle le couplage cross-fréquentiel

(Sauseng et Klimesch, 2008; Hyafil et al., 2015) et qui est classiquement observé entre les oscillations thêta et gamma (Lisman et Jensen, 2013). Nous illustrerons des cas particuliers dans les prochains paragraphes.

2. Analyse des oscillations

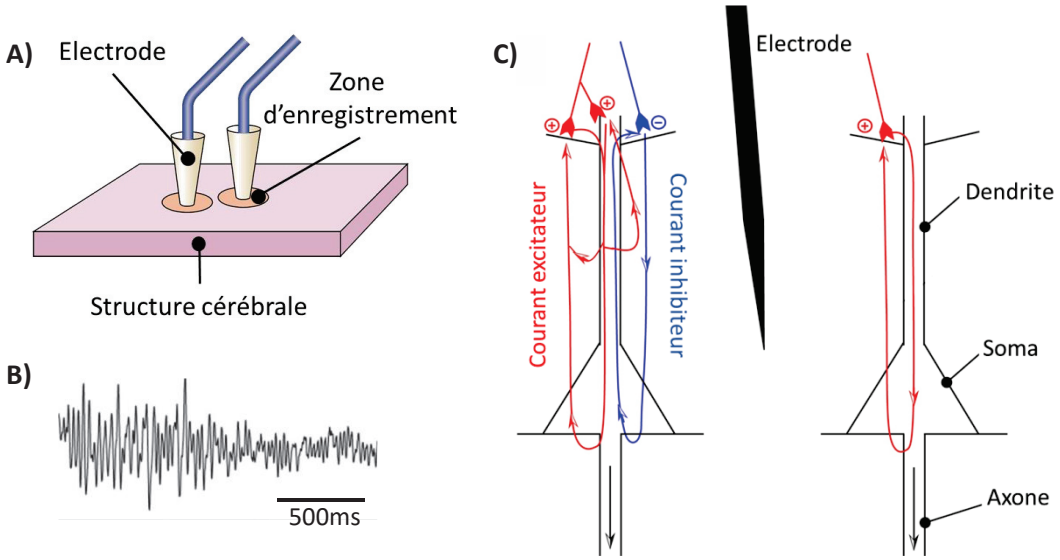


Figure 30 : *Le potentiel de champ local. A) Représentation schématique de l'enregistrement des LFP (adaptée de Varela et al., 2001). B) Tracé brut obtenu par cet enregistrement (données personnelles). C) Les activités électriques (excitatrices ou inhibitrices, circulant en sens inverse) engendrent des courants électriques qui circulent en boucles fermées à l'intérieur et à l'extérieur du neurone. Le signal mesuré est la combinaison des activités de milliers de neurones, en fonction de la position et de l'orientation des cellules (adaptée de Freeman, 1991).*

Une des techniques qui permet d'étudier ces oscillations est l'enregistrement de potentiels de champs locaux (Local Field Potential, LFP) grâce à une électrode implantée dans une structure cible du cerveau (Figure 30A). L'électrode enregistre alors l'activité globale de la population de neurones autour de sa pointe, et le signal LFP résultant correspond à la somme de l'activité synchrone des neurones au sein de cette population (Figure 30B et C). Plus précisement, cette activité globale enregistrée resulterait de la combinaison des potentiels synaptiques, des repolarisations du soma (corps cellulaire du neurone) et des dendrites, et des activités oscillatoires des membranes des neurones.

Le champ mesuré est une combinaison non linéaire de ces énergies électriques, dépendant de la topologie de la zone enregistrée. Le nombre de neurones participant à ce signal dépend également de la structure cérébrale enregistrée ainsi que de l'impédance de l'électrode. Ce nombre peut varier de 100 à 10000 neurones (Kay et al., 2014). Nous ne débattrons pas ici sur la question concernant le lien qui unit les oscillations du LFP et la synchronie des neurones (c'est-à-dire la question de qui est à l'origine de qui), nous admettons

simplement le fait que l'un est indissociable de l'autre (Engel et Singer, 2001) et qu'à ce titre, l'exploration des LFP oscillatoires nous permet de tester différents paramètres (Figure 31) :

- L'observation d'une activité oscillatoire dans une bande de fréquence donnée, ou bien l'augmentation de la puissance de cette oscillation (pour revue voir Tallon-Baudry et Bertrand, 1999) indique l'existence d'une meilleure coopération cellulaire dans une structure cérébrale donnée. Il faut noter que cette augmentation de puissance/amplitude peut également signaler, au-delà d'une augmentation de la coopération cellulaire, une augmentation du nombre de neurones qui participent au réseau (Eeckman et Freeman, 1990; Litaudon et al., 2008; Schoppa, 2006).
- Si deux structures oscillent à la même fréquence au même moment, la mesure de la cohérence de phase de leur activité oscillatoire permet de tester l'existence d'un couplage fonctionnel entre deux structures (Bressler et Kelso, 2001 ; Varela et al., 2001). Une cohérénce de valeur 0 indique une indépendane entre les signaux, une valeur de 1 reflète une relation linéaire.

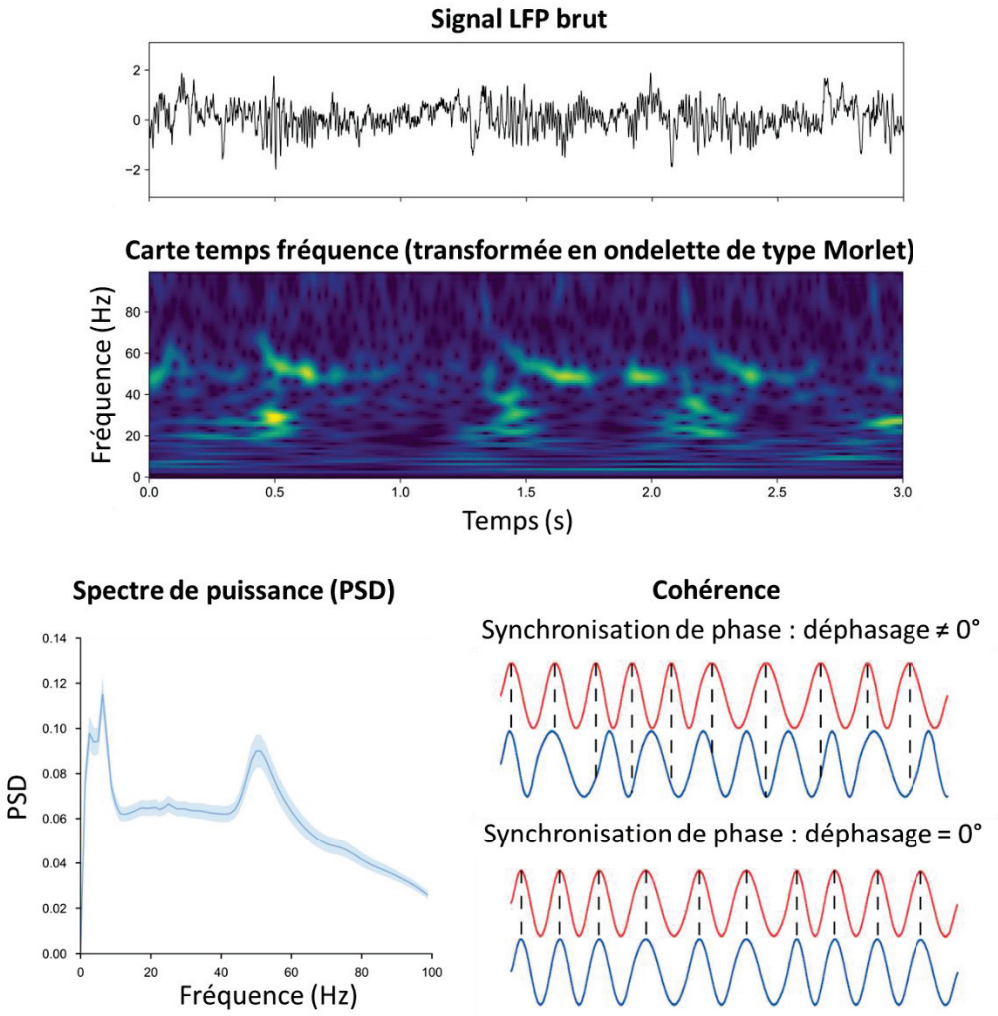


Figure 31 : *Résumé des méthodes de traitement du signal.*

Comme nous l'avons mentionné un peu plus haut, la synchronisation oscillatoire est observée dans tous les systèmes sensoriels, dans le système moteur, dans les structures associatives et de mémoire et ce chez différentes espèces animales : oiseaux, rongeurs, primates, Homme … (pour revue voir Engel et al., 2001). Nous allons entrer un peu plus en détail dans les deux parties suivantes, sur les oscillations et leur rôle dans le système olfactif d'une part et dans le conditionnement de peur d'autre part. Nous aborderons également le rôle du rythme respiratoire sur les rythmes cérébraux.

II. Les oscillations dans le système olfactif et le rôle clé du rythme respiratoire

Trois bandes de fréquences principales ont été identifiées comme ayant un rôle fonctionnel significatif dans le traitement olfactif chez les rongeurs : le thêta, le bêta et le gamma (pour revue voir Kay, 2014 ; Martin et Ravel, 2014). Ces différentes bandes sont associées à des comportements donnés et interagissent entre elles. Par exemple, le thêta suit et représente le rythme respiratoire au niveau du bulbe olfactif. Les oscillations bêta sont présentes lors de l'apprentissage et la sensibilisation aux odeurs. Enfin, les oscillations gamma quant à elles sont associées au traitement local des odeurs.

1. Le rythme thêta et la respiration

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2, l'échantillonnage des odeurs se fait de façon rythmée au travers de la respiration : les molécules odorantes arrivent sur la muqueuse olfactive lors de l'inspiration et en sont évacuées lors de l'expiration. De cette stimulation rythmée des neurorécepteurs à la périphérie, découle une activité oscillatoire calée sur le rythme respiratoire dans le bulbe olfactif (Figure 32). Ces oscillations ont été nommées oscillations thêta en référence au thêta hippocampique avec lequel elles ont des bandes de fréquence recouvrantes (4-12Hz). Cependant, un nombre croissant d'auteurs parlent plutôt de rythme thêta respiratoire puisque la plupart du temps ces oscillations suivent le rythme respiratoire (Kay et al., 2009). Plusieurs travaux réalisés notamment dans l'équipe, ont montré que l'activité de décharge des cellules mitrales du bulbe olfactif est organisée selon les différentes phases du cycle respiratoire (pour revue voir Buonviso, 2006) et que l'arrivée d'une odeur induit une réorganisation temporelle de cette décharge.

En 1942, Lord Adrian décrivant les activités oscillatoires dans le BO du hérisson anesthésié, constata que cette activité était observée non seulement en présence d'une odeur, mais aussi en l'absence d'odeur (à l'appréciation du nez humain). Il proposa alors l'idée que ces activités étaient causées par une stimulation mécanique uniforme lors de l'inspiration, c'est-à-dire que cette activité serait générée par l'air entrant dans la cavité nasale. Cette hypothèse a été

confirmée dans plusieurs études par la suite et confortée par la découverte de la mécanosensibilité des neurorécepteurs olfactifs (Grosmaitre et al, 2007).

Le bulbe olfactif n'est pas la seule région olfactive où l'on peut trouver des activités oscillatoires en lien avec la respiration, on en retrouve également dans des structures en aval du BO comme le cortex piriforme (Litaudon et al., 2003 ; Fontanini et al., 2003; Fontanini et Bower, 2005), le tubercule olfactif (Carlson et al., 2014) et le thalamus médiodorsal (Courtiol et Wilson, 2016).

Par exemple, dans le cortex piriforme, l'activité neuronale est fortement influencée par la respiration (Litaudon et al., 2003). De plus, on peut observer une nette distinction entre la partie antérieure et postérieure du cortex piriforme. Dans la partie antérieure, on observe une synchronisation de phase entre les neurones corticaux et la respiration, qui est similaire à celle observée pour le bulbe olfactif. En revanche, pour la partie postérieure, cette synchronisation ne se fait pas au même moment de la phase du cycle respiratoire que ce que l'on observe avec le BO. Cette synchronisation de phase pourrait jouer un rôle dans le codage de la qualité et de l'intensité de l'odeur (Spors et Grinvald, 2002).

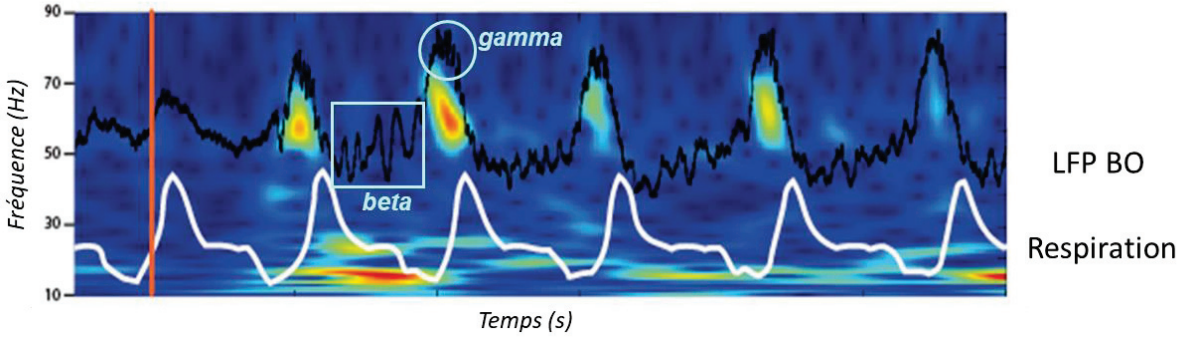


Figure 32 : *Modulation des activités oscillatoires du bulbe olfactif par la respiration. Représentation du signal brut LFP du bulbe olfactif (tracé noir) et de la carte temps fréquence correspondante. Le signal brut LFP suit l'oscillation de la respiraiton (tracé blanc). Les oscillations rapides bêta et gamma se greffent à des instant particuliers du cycle du thêta respiratoire (Adaptée de Cenier et al., 2008).*

2. Les rythmes bêta et gamma

Les oscillations gamma dans le système olfactif ont été abondamment étudiées par le groupe de Walter Freeman (Freeman et Schneider,1982; Eeckman et Freeman, 1990) dont les travaux ont montré que l'amplitude de ces oscillations augmente lorsque l'animal est dans un état attentionnel élevé. A l'inverse, lors de l'échantillonnage d'une odeur, l'amplitude des oscillations gamma diminue, que l'odeur ait ou non une valeur comportementale pour l'animal, et que celle-ci soit innée ou apprise (Gray et Skinner, 1988b). Cette diminution d'activité gamma est généralement remplacée par l'émergence d'une activité dans la bande bêta pendant l'échantillonnage de l'odeur, dans le bulbe olfactif (Martin et al, 2004b ; Lowry et Kay 2007) et dans le cortex piriforme (Martin et al, 2006).

Plusieurs études réalisées essentiellement sur l'animal anesthésié, ont montré que les activités rapides bêta et gamma dans le système olfactif étaient modulées par le rythme respiratoire (pour revue voir Buonviso et al, 2006). Ainsi, Buonviso et al. (2003) ont montré que dans le bulbe olfactif, les bouffées de gamma émergeaient au moment de la transition entre inspiration et expiration. Ces résultats ont été confirmés plus tard par Cenier et al. (2009) qui ont montrés que les rythmes gamma et bêta induits dans le bulbe olfactif en réponse à une odeur se produisent de façon alternée pendant le cycle respiratoire (Figure 32). Rojas-Libano et al. (2014) ont également trouvé un fort couplage phase–amplitude entre le thêta respiratoire dans le bulbe olfactif et le gamma (40-100Hz), c'est-à-dire que l'amplitude du gamma était synchronisée sur la phase du thêta respiratoire.

III. Oscillations et respiration : un lien au-delà des structures olfactives

Longtemps cet entrainement des oscillations par la respiration a été considéré comme étant restreint aux aires olfactives, mais récemment plusieurs études ont pu mettre en évidence que les régions olfactives ne sont pas les seules où l'on peut constater cette modulation respiratoire (Tableau 1).

Structure cérébrale	Auteur et date
Hippocampe	Lockmann et al., 2016 ; Lockman et Tort, 2018 ; Yanovsky et al., 2014 ; Nguyen et al., 2016
Cortex pariétal	Zhong, et al., 2017
Cortex somatosensoriel	Ito et al., 2014
Cortex préfrontal	Lockmann et al., 2016 ; Lockman et Tort, 2018 ; Zhong et al., 2017 ; Biskamp et al., 2017 ; Moberly et al., 2018 ; Bagur et al., 2018
Thalamus	Courtiol et al., 2016 ; Karalis et Sirota, 2018
Noyau accumbens	Karalis et Sirota, 2018
Cortex orbitofrontal	Koszeghy et al., 2018
Amygdale	Tort et al., 2018a ; Karalis et Sirota, 2018
Cortex entorhinal latéral	Tort et al., 2018

Tableau 1 : *Structures cérébrales non olfactives modulées par la respiration*

Comme cela a été observé dans les aires olfactives, le rythme thêta respiratoire module également la puissance des activités oscillatoires plus rapides dans des régions cérébrales non olfactives. Par exemple, le rythme respiratoire module la puissance des oscillations gamma dans le cortex en tonneau ainsi que le cortex préfrontal (Ito et al., 2014; Biskamp et al., 2017). Par ailleurs, Lockman et al (2018) ont montré sur le rat anesthésié, que le rythme respiratoire

(mais pas le rythme thêta) module l'amplitude des oscillations bêta dans le bulbe olfactif et l'hippocampe.

La respiration n'est donc plus à considérer seulement comme un moyen de fournir de l'oxygène à l'organisme, mais également comme un moyen moduler un rythme lent cérébral susceptible de faciliter la coordination des activités neuronales entre des aires cérébrales distantes et de moduler les processus cognitifs sous-jacents (pour une revue récente, voir Tort et al, 2018b; Heck et al, 2017) (Figure 33 pour une vue d'ensemble).

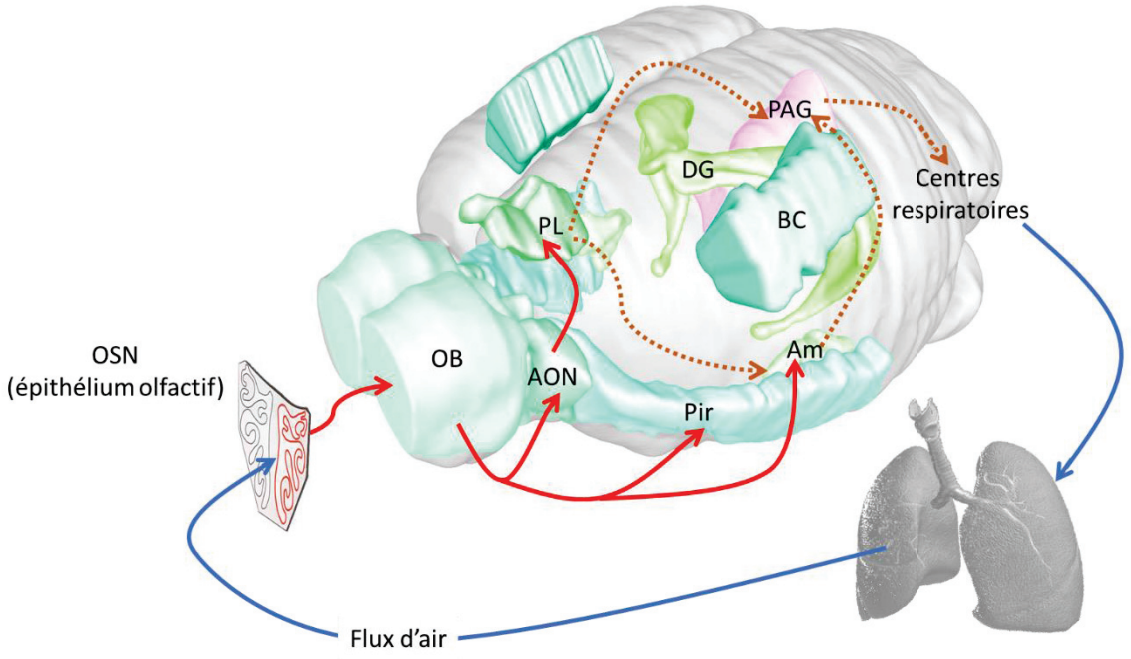


Figure 33 : *La respiration nasale entraîne les rythmes cérébraux des régions cérébrales olfactives et non olfactives. La respiration est détectée par les neurones olfactifs sensoriels mécanosensibles (OSN) de l'épithélium olfactif et propagée aux zones olfactives comme le bulbe olfactif (BO), le noyau olfactif antérieur (AON), le cortex piriforme (Pir) et l'amygdale (Am). Ce signal respiratoire est également propagé dans des régions non olfactives comme le cortex préfrontal prélimbique (PL), le cortex en tonneaux (BC) et le gyrus denté de l'hippocampe (DG). Certaines de ces régions communiquent à leur tour avec des structures du mésencéphale (comme la substance grise périaqueducale (PAG)) ou les centres respiratoires du tronc cérébral (sortie motrice). Les connections réciproques ainsi que toutes les structures pour lesquelles la littérature montre un entrainement par la respiration n'ont pas été représentées par soucis de clarté.*

IV. Oscillations et conditionnement de peur

Dans le chapitre 2 nous avons décrit le réseau impliqué dans le conditionnement de peur, voyons maintenant comment les activités oscillatoires sont modifiées au sein de ce réseau pendant les différentes phases du conditionnement de peur (Figure 34 pour bilan).

1. Thêta

Différentes études ont montré que l'acquisition et l'expression de la peur implique une synchronisation de l'activité thêta dans l'amygdale basolatérale, le cortex préfrontal médian et l'hippocampe. Paré et Collins (2000) ont montré chez le chat que pendant l'anticipation d'un stimulus nociceptif la réponse des neurones de l'amygdale latérale augmente, ainsi que la synchronisation de leur décharge sur le rythme thêta. Ces observations ont été confirmées chez d'autres espèces et étendues à un réseau plus large. Ainsi, Popa et al (2010) ont montré chez le rat que les performances des animaux lors du rappel d'une mémoire de peur sont corrélées au niveau de cohérence dans la bande thêta entre l'amygdale, le cortex préfrontal et l'hippocampe pendant la période de sommeil paradoxal qui suit le conditionnement, suggérant un rôle des oscillations thêta dans la consolidation de la mémoire de peur. Chez la souris, on observe également une augmentation de la synchronisation dans la bande thêta entre l'hippocampe (CA1) et l'amygdale latérale pendant la consolidation et le rappel de souvenirs de peur (Seidenbecher et al., 2003 ; Narayanan et al., 2007). Chez les primates, il a été constaté une augmentation de la puissance dans la bande thêta dans l'amygdale et le cortex cingulaire antérieur lors de l'exposition à un stimulus aversif, ainsi qu'une augmentation de la cohérence dans la bande thêta entre ces deux structures (Taub et al., 2018). A l'inverse de ce qui est observé pour l'acquisition ou le rappel d'une mémoire de peur, l'extinction de la réponse de peur s'accompagne d'une diminution de la synchronisation dans la bande thêta dans le réseau amygdale-cortex préfrontal-hippocampe (Lesting et al, 2011).

Des données récentes sont apparues dans la littérature et ont mis en évidence le rôle d'une oscillation, dont la fréquence est centrée sur 4Hz, dans l'expression de la peur. Karalis et al (2016) ont montré que lorsque la souris exprime un comportement de peur, en l'occurrence du freezing, une oscillation à 4Hz est générée dans le circuit amygdalo-préfrontal et coïncide temporellement avec le comportement de freezing. Fait intéressant, cette oscillation prédit le début et la fin de chaque épisode de freezing, et synchronise les circuits préfrontaux-amygdaliens. Les auteurs ont par ailleurs montré que si l'on induisait par optogénétique des oscillations à 4Hz dans le cortex préfrontal, cela déclenchait une réponse de peur ainsi qu'une synchronisation de l'activité entre l'amygdale et le cortex préfrontal. A la suite de ces travaux et du débat récent concernant le rôle de la respiration sur les rythmes cérébraux (décrits dans le II et III de ce chapitre), Moberly et al (2018) ont fait l'hypothèse que l'oscillation à 4Hz observée dans le mPFC était sous la dépendance du rythme respiratoire. En effet lorsque la souris a peur, son rythme respiratoire se stabilise autour de 4Hz, une

observation qui confirme ce qui a été montré chez le rat dans notre équipe (Hegoburu et al, 2011). Les auteurs de cette étude ont montré que les oscillations à 4Hz dans le mPFC étaient corrélées avec le rythme respiratoire ainsi qu'avec l'activité du bulbe olfactif. De plus la suppression des afférences olfactives au cortex prélimbique réduit significativement l'oscillation à 4Hz, suggérant que cette dernière est dépendante de l'input olfactif. Cette hypothèse a été confirmée par une étude récente de Bagur et al (2018) qui ont utilisé la technique d'optogénétique sur des souris génétiquement modifiées pour perturber l'oscillation à 4Hz dans le bulbe olfactif et la remplacer par une oscillation à 13Hz. Cette perturbation a eu pour conséquence de diminuer spécifiquement le maintien de la réponse de peur des animaux, sans en altérer l'initiation. Les auteurs ont également fait des stimulations du bulbe olfactif par optogénétique à différentes fréquences et enregistré les signaux LFP induits dans le mPFC. Les résultats montrent que l'amplitude des signaux recueillis est maximale pour une stimulation à 4Hz.

2. Gamma

Le rôle des oscillations gamma dans la mémoire émotionnelle a surtout été étudié chez l'Homme (pour revue voir Headley et Paré, 2013) chez qui il a été montré que les stimuli émotionnels, particulièrement ceux de valence négative, induisent de robustes oscillations gamma (Luo et al, 2007 ; Oya et al, 2002), même lorsqu'ils sont présentés de façon subliminale (Luo et al, 2009).

Chez l'animal, il y a assez peu de données sur le rôle des oscillations gamma dans les mémoires de peur. Chez la souris, Courtin et al. (2014) ont montré une augmentation de l'activité oscillatoire dans la bande gamma dans l'amygdale suite à un conditionnement de peur. De plus, la persistance de ces oscillations gamma pendant la procédure d'extinction est un bon prédicteur du recouvrement spontané de la peur à long-terme. Fenton et al (2016) ont observé que l'activité gamma dans le cortex préfrontal est plus élevé chez les souris femelles qui présentent une forte réponse de peur apprise dans un conditionnement de peur au son. Dans le même type de conditionnement, Headley et Weinberger (2011) ont montré que la puissance de l'oscillation gamma induite dans le cortex auditif primaire, en réponse au son associé au choc, pouvait prédire les performances de l'animal lors d'un test de rappel à 24h. De plus, dans cette même région, lors de la présentation du stimulus sonore, on constate une synchronisation de l'activité unitaire en phase avec les oscillations gamma.

3. Couplage thêta-gamma

Comme décrit dans le précedemment pour les oscillations dans le système olfactif, des interactions entre les bandes de fréquences thêta et gamma dans le conditionnement de peur ont également été rapportées. Ainsi, dans une première étude utilisant un conditionnement de peur discriminatif dans lequel des souris reçoivent un son qui prédit l'arrivée un choc (c'est

le stimulus « danger ») ou un autre son qui n'est pas associé à un choc (c'est le stimulus « sécurité »), Likhtik et al. (2014) ont mis en évidence une augmentation de la synchronisation dans la bande thêta entre le mPFC et la BLA chez les animaux qui réussissent cette tâche et font la différence entre danger et « sécurité ». Dans l'étude suivante, le même groupe a montré que dans la BLA les oscillations gamma lentes (40-70Hz) et rapides (70-120Hz) étaient couplées à des phases distinctes de l'oscillation thêta (Stujenske et al ; 2014). Ils ont observé que lors de l'expression d'un comportement de peur (situation « danger »), c'est le couplage thêta-gamma rapide qui est augmenté, alors même que la puissance dans la bande de fréquence gamma rapide est réduite. A l'inverse, pendant les périodes de « sécurité », une augmentation de la puissance dans la bande de fréquence gamma rapide, ainsi qu'un fort couplage mPFC thêta-BLA gamma est observé.

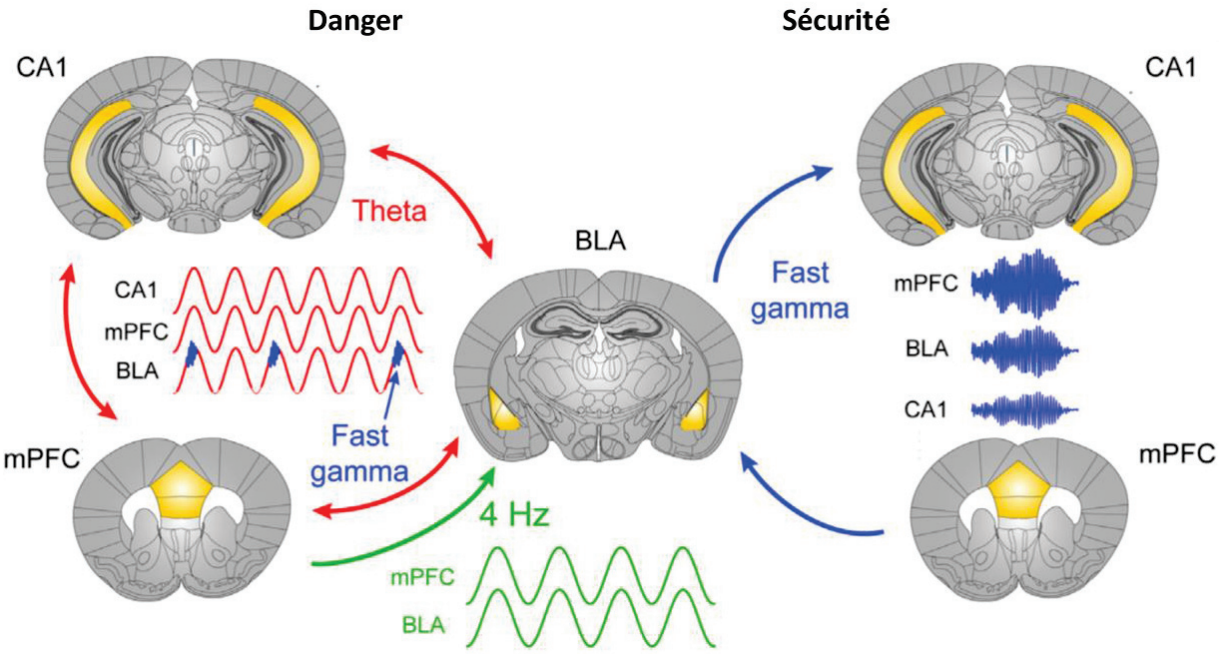
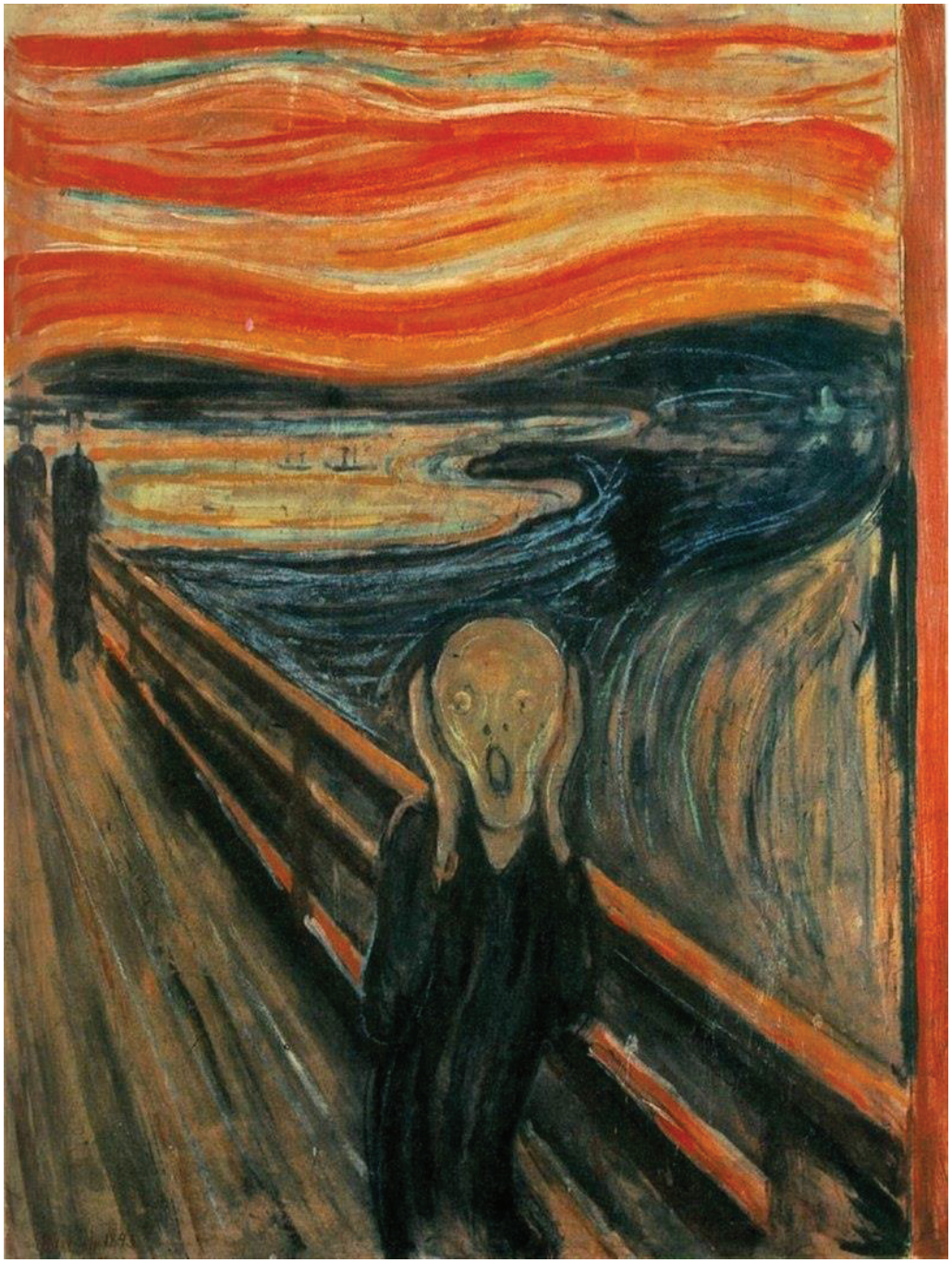


Figure 34 : *Les oscillations au sein du réseau hippocampe (CA1)-cortex préfrontal (mPFC)-amygdale(BLA). A gauche : Face à un stimulus prédisant un choc électrique il y a une augmentation de la cohérence et de la puissance dans la bande thêta au sein du réseau. Dans cette situation, la puissance en gamma rapide (fast gamma : 70-120Hz) est faible mais calé sur le cycle du thêta. Une oscillations 4Hz émergeant du cortex préfrontal synchronise cette structure avec l'amygdale durant les périodes de freezing. A droite : Face à un stimulus associé à l'absence de choc électrique il y a une augmentation de la puissance en gamma rapide dans les 3 structures (Bocchio et al., 2017).*

Travail expérimental

Etude 1 : Vocalisations Ultrasonores et activités oscillatoires



Le Cri, par Edvard Munch (1893)

Introduction aux vocalisations ultrasonores

La première partie de ce travail de thèse est consacrée à l'étude de l'impact de l'émission des vocalisations ultrasoniques sur les activités oscillatoires dans le circuit neuronal de la peur, en lien avec la respiration et le comportement de l'animal.

Lorsque le rat est face à une situation riche émotionnellement, il émet des vocalisations, qui présentent des caractéristiques différentes selon la valence émotionnelle. Ainsi, dans une situation aversive, différentes réponses de défense sont exprimées, l'une d'entre elles étant l'émission de vocalisations ultrasoniques à 22kHz qui se produisent préférentiellement lorsque l'animal exprime un comportement de freezing. A partir de maintenant nous désignerons ces vocalisations sous le terme d'USV (du terme anglais UltraSonic Vocalizations). Ces USV sont inaudibles à l'oreille humaine, et leur étude nécessite l'utilisation d'un équipement spécialisé. De ce fait la plupart des travaux concernant la neurobiologie de la mémoire émotionnelle ne mesurent pas cet indice, lui privilégiant la mesure du freezing, plus facilement accessible. Au cours de mon travail de thèse qui était basé sur l'enregistrement électrophysiologique multisite des activités oscillatoires dans le réseau de la mémoire de peur, nous avons observé de façon fortuite que l'émission de ces USV avait un impact sur les activités oscillatoires enregistrées (Figure 35). Cela m'a amenée à m'intéresser dans un premier temps à cette question très peu étudiée dans la littérature, à savoir : que se passe-t-il dans le réseau de la mémoire de peur lorsque l'animal émet des USV ?

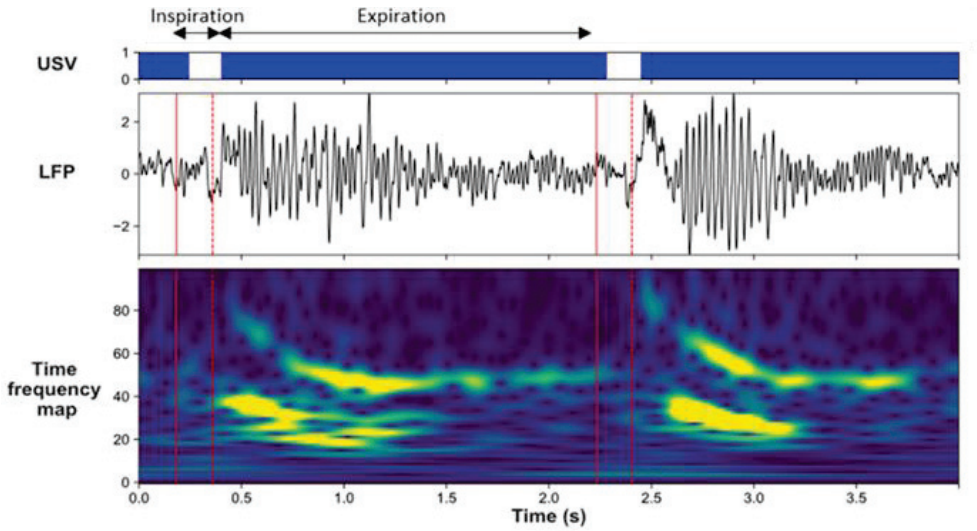


Figure 35 : *Exemple d'enregistrement au cours d'une séance de conditionnement. Les tracés individuels représentent, depuis le haut, les USV, le signal LFP brut enregistré dans le cortex piriforme et la carte temps-fréquence correspondante (en ordonnée la fréquence du signal LFP, en abscisse le temps en millisecondes). La puissance du signal LFP est représentée en utilisant une échelle de couleur allant du bleu au rouge à mesure que la puissance augmente. Les lignes pleines rouges verticales représentent la transition entre l'expiration et l'inspiration, alors que celles en pointillées représentent la transition entre l'inspiration et l'expiration.*

Avant de présenter les résultats de cette étude, nous allons voir dans les prochains paragraphes, par quels organes ces ultrasons sont générés, quelles sont leurs principales caractéristiques acoustiques, dans quels contextes environnementaux ils sont émis, et quelles pourraient être leurs fonctions.

I. Les organes de production des USV

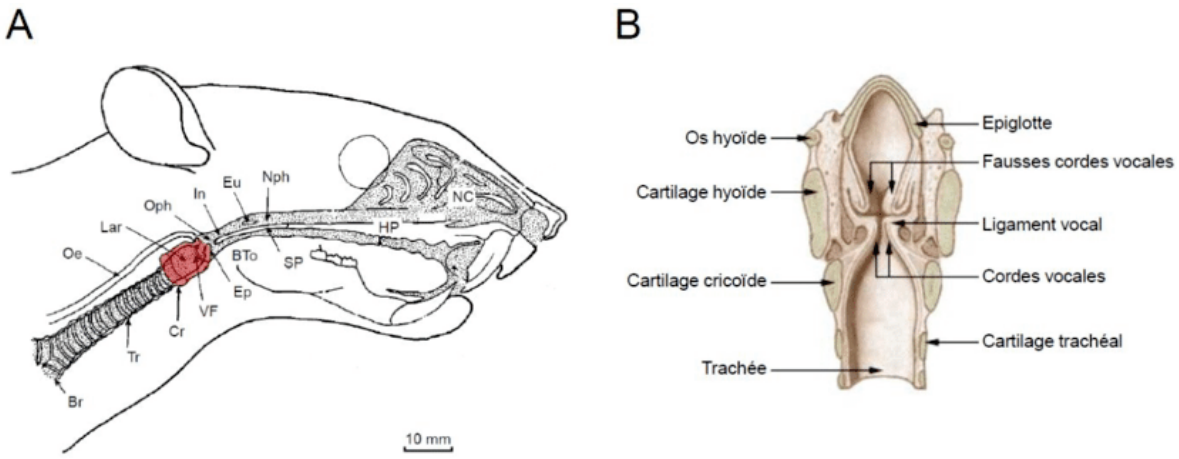


Figure 36 : *Coupe sagittale des voies respiratoires supérieures du rat. Abréviations : Br : Bronches, BTo : Base de la langue, Cr : Cartilage cricoïde du larynx, Ep : Epiglotte, Eu : ouverture des tubes d'Eustache, HP : Palais, In : choanes (orifices postérieurs internes des cavités nasales), Lar : Larynx, NC : Cavité Nasale, NPh : Nasopharynx, Oe : OEsophage, Oph : Orthopharynx, SP : Voile du palais, Tr : Trachée, VF : Cordes vocales (Brudzynski et Fletcher, 2010). B. Anatomie détaillée du larynx (Page wikipédia du larynx).*

Rappelons brièvement le mécanisme d'émission de vocalisations audibles chez le rat, qui se rapproche du mécanisme de production de la parole chez l'Homme. Ces vocalisations sont produites lors de l'expiration, par vibration des cordes vocales au contact de l'air éjecté des poumons. On peut distinguer 3 acteurs majeurs : le larynx (Figure 36), les cordes vocales et la respiration.

Lorsqu'une vocalisation doit être émise, les cordes vocales se rapprochent, l'air venant des poumons s'accumule dans la partie inférieure du larynx (la glotte), entrainant ainsi une surpression sous-glottique (Figure 37A). Quand cette surpression atteint un seuil, les cordes vocales s'entrouvrent, l'air est alors libéré dans la partie supérieure du larynx (Figure 37B), les cordes vocales se referment (Figure 37C), et ainsi de suite. L'air qui est ainsi expulsé, forme un son. L'ouverture des cordes vocales peut être modulée pour laisser échapper l'air plus ou moins rapidement, modulant ainsi la fréquence du son émis.

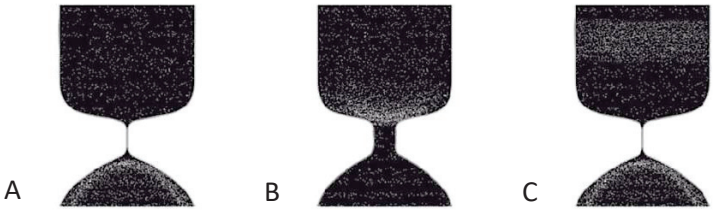


Figure 37 : *Modification de la pression sous- et sup-glottale engendrée par les vibrations des cordes vocales. A) augmentation de la pression sous-glottale. B) Libération de l'air pressurisé dans la partie sup-glottale et diminution de la pression dans la partie sous-glottale. C) Ré-augmentation de la pression sous-glottale (Finck et Lejeune, 2010, 433).*

Qu'en est-il de la production des USV ? Si les acteurs sont les mêmes que ceux impliqués dans la production des vocalisations audibles, les mécanismes fins sont différents. Ainsi, il semble que la vibration des cordes vocales ne soit pas le mécanisme de base de la production des USV. En effet, Sanders et al (2001) ont réalisé une expérience au cours de laquelle ils ont stimulé la substance grise périaqueducale pour induire des USV sur l'animal anesthésié, et ils ont observé que les cordes vocales ne vibraient pas lorsque les USV étaient induits. Les USV seraient plutôt générés par un mécanisme de sifflet dans le larynx. Différentes études ont démontré l'implication du larynx dans la production des USV en sectionnant le nerf laryngé chez le rat adulte (Roberts, 1975 ; Wetzel, 1980), ce qui a comme conséquence d'empêcher leur production. De même, la mesure de l'activité des muscles au niveau du larynx démontre que ceux-ci sont actifs lors de l'émission d'USV (Riede 2011). Une constriction du larynx est également observée par endoscopie chez des rats anesthésiés produisant des USV grâce à une stimulation de la substance grise périaqueducale (Sanders et al., 2001). Cette étude a été complétée par Johnson et al. (2010) qui ont utilisé un modèle de larynx excisé avec différents degrés de fermeture des cordes vocales pour montrer que le larynx de rat était capable de produire toute la gamme des ultrasons rapportés in vivo. On peut noter que le larynx est déjà innervé et fonctionnel à la naissance et qu'il va continuer de se développer jusqu'à l'âge adulte (Alli et al, 2013). Ceci est un autre argument en faveur de l'implication de ces organes dans l'émission des USV qui sont déjà présents chez le raton.

II. Le lien étroit avec la respiration

Comme c'est le cas pour la production de la parole chez l'homme ou l'émission de vocalisations audibles chez l'animal, il y a un lien très étroit entre la production d'USV et la respiration, qui fournit un flux d'air nécessaire à la genèse d'ultrasons par les organes vocaux.

En plaçant une thermistance juste devant les narines de l'animal, Robert (1972) montra que les USV du rat étaient émis de manière quasi exclusive lors de la phase expiration du cycle respiratoire, c'est-à-dire lorsque l'air est expulsé des poumons. Riede (2011) observa les mêmes résultats en effectuant des mesures de la pression dans la trachée d'un rat adulte vigile qui émet des USV. Il montra que la pression sous glottique était plus élevée pendant l'émission du son que pendant les « expirations silencieuses » (sans USV). La variation de cette pression sous-glottique (entre 0.5 et 2.5kPa chez le rat) permet la modulation de la fréquence d'émission des USV. Par des mesures du flux d'air respiratoire grâce à un capteur de pression implanté dans la cavité nasale de l'animal, Sirotin et al. (2014) observent que pendant l'émission d'USV, la pression dans cette cavité est proche de la pression atmosphérique (et donc un flux d'air très faible), puis qu'ensuite, cette pression augmentait pendant l'expiration silencieuse (indiquant un flux d'air plus intense). Le flux d'air extrêmement faible observé peut même être un bon indice de la présence d'USV (Sirotin et al., 2014). Hegoburu et al., (2011) (et plus tard Assini et al., 2013) ont par ailleurs pu observer une corrélation forte entre la

durée de l'expiration et celle de l'USV 22Hz associé (Figure 38), suggérant ainsi une contrainte du cycle respiratoire par l'USV qui force l'allongement de la phase expiratoire. La durée de l'expiration a cependant une limite physiologique, et de ce fait, la longueur de l'USV émis est à son tour limitée par les paramètres de la respiration.

Certaines études montrent également que l'émission d'USV s'accompagne de la variation d'autres paramètres physiologiques que la respiration, comme une augmentation du rythme cardiaque et de la pression sanguine (Frysztak et Neafsey, 1991; Antoniadis et McDonald, 1999; Walker et Carrive, 2003).

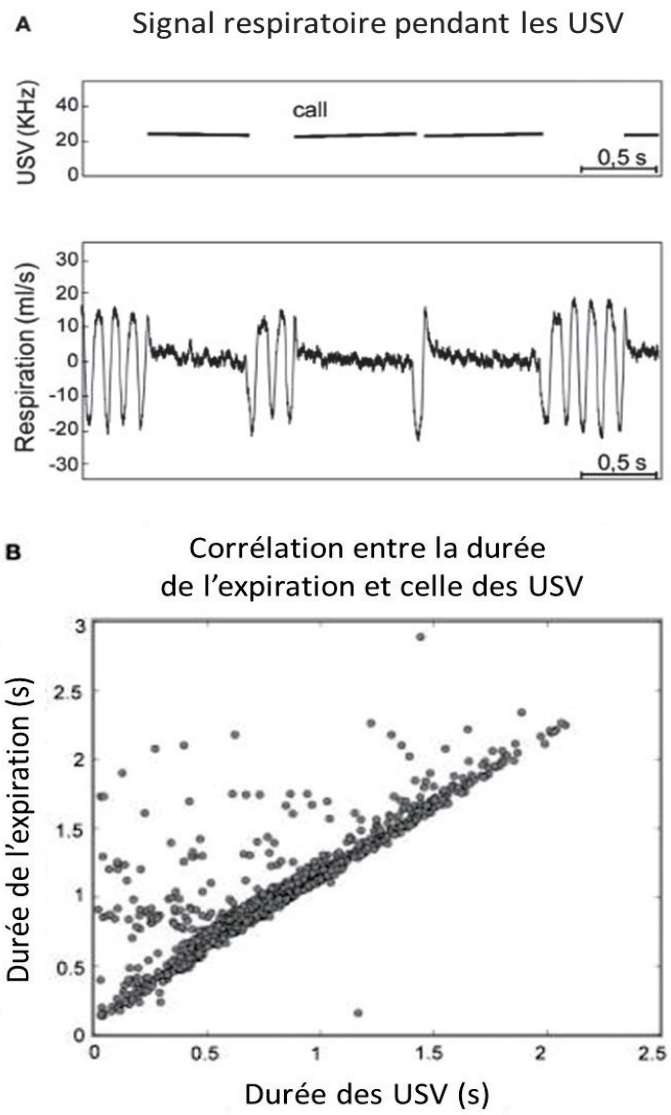


Figure 38 : *Lien entre respiration et USV. A. Exemple de respiration (en bas) observée au cours de l'émission d'USV (spectrogramme de fréquence en haut). B. Corrélation entre la durée des USV et celle de l'expiration associée (Hegoburu et al., 2011).*

III. Les différents types d'USV

Le mécanisme de sifflet à l'origine de la production des USV permet de couvrir une large gamme d'ultrasons grâce aux différents paramètres modulables décrits précédemment. Tout au long de sa vie, depuis les premiers jours après la naissance jusqu'à l'âge adulte, le rat émet des USV. On distingue classiquement trois classes d'USV qui dépendent de l'âge de l'animal et du contexte environnemental et émotionnel (pour revue, voir Portfors, 2007 ; Brudzynski, 2013). La première concerne les USV observés chez le raton, notamment lorsqu'ils sont isolés de leur mère. On parle d'USV d'isolement. Ils sont émis dans la gamme de fréquence de 30-65 kHz (Hofer, 1996). Les deux autres catégories sont observées chez le rat juvénile et adulte et sont définies classiquement comme les USV 22kHz et les USV 50kHz. Nous allons nous intéresser plus précisément à ces deux dernières catégories (voir Figure 39 pour une classification générale).

1. USV 22kHz : vocalisations de détresse

Ces USV ont une fréquence qui oscille entre 20 et 35KHz (Blanchard et al., 1992 ; Sales, 1972) et qui est très peu modulée : elle varie seulement de 1 à 6kHz pour un même individu. La durée d'une vocalisation est très variable puisqu'elle se situe entre 20 et 3400ms. Cette large gamme de durée a conduit à établir une distinction entre les USV courts et les longs. Les USV courts, de 20 à 300ms, se produisent souvent juste après l'émission d'USV longs suggérant ainsi qu'ils ont pour rôle de moduler la signification des USV longs (Brudzynski, 1994). Les USV longs quant à eux durent de 300 ms à plus de 3000ms et leur fréquence oscille entre 20 et 23kH, avec des pics observés à 30kHz (Brudzynski, 1993).

Les contextes dans lesquels les USV 22kHz sont émis laissent penser que ces vocalisations sont le reflet d'un état émotionnel négatif chez l'animal. Différentes études ont confirmé cette hypothèse. Par exemple, en présence d'un prédateur (Blanchard et al. 1990), d'un congénère agressif (Brudzynski et Ociepa, 1992 ; Vivian et Miczek, 1993) ou dans un état de manque lié au sevrage de drogue (Vivian et al, 1994). Les USV 22kHz sont aussi émis lorsque le rat est confronté à un stimulus aversif inévitable comme par exemple un choc électrique (Borta et al, 2006) ou au contexte dans lequel ce choc a été délivré. Dans ce dernier cas, le rat a associé le contexte au stimulus aversif et perçoit alors cet environnement comme menaçant, ce qui le conduit à émettre des USV par anticipation (Simola, 2015). Par ailleurs, l'injection systémique d'anxiolytiques tels que des benzodiazépines ou des agonistes des récepteurs à la sérotonine (5HT1A), diminuent la quantité d'USV émise par le rat en réponse à un conditionnement de peur ou une situation stressante (Cuomo et al., 1988; Jelen et al., 2003). Parallèlement, des drogues anxiogènes peuvent augmenter la quantité d'USV à 22 kHz émise (Jelen et al. 2003). Le taux de vocalisations à 22kHz serait positivement corrélé à l'intensité de la stimulation aversive du choc électrique délivré (Wohr et al., 2005 ; Hegoburu et al., 2011) et à la réponse de peur mesurée par le freezing (Choi et Brown, 2003).

Aussi, on constate que les USV 22kHz sont émis principalement lorsque le rat montre un comportement de freezing (Brudzynski et al, 1993). En effet, la constriction des cordes vocales dans le mécanisme du sifflet serait facilitée lors du freezing. Walker et Carrive (2003) suggèrent que l'immobilisation du thorax est nécessaire pour la production d'USV. Cette immobilisation est une composante à part entière de la posture du freezing qui permet la stabilisation à la fois des parties inférieures et supérieures du tronc. Cependant, Boulanger-Bertolus et al. (2017) ont montré que bien que la production d'USV 22 kHz était optimale pendant le freezing, elle existait également lors de la locomotion à la fois chez le rat adulte et juvénile, bien que ces cas soient rares.

L'ensemble de ces données suggèrent donc bien que l'émission d'USV 22kHz révèle un état émotionnel négatif chez l'animal. Concernant la fonction de ces USV, une hypothèse assez largement admise dans la littérature est qu'ils servent de signaux d'alarme pour alerter les congénères de la présence d'un danger. Cette hypothèse a tout d'abord été émise par Blanchard et al (1991) qui ont montré que l'émission d'USV en présence d'un prédateur (en l'occurrence un chat) était facilitée par la présence de congénères familiers (effet d'audience) et qu'elle induisait chez eux une série de comportements défensifs alors qu'ils ne voyaient pas le prédateur. D'autres expériences ont consisté à rejouer en playback des USV enregistrés sur des rats ayant reçu des chocs électriques, et à observer leur effet sur des animaux naïfs. Brudzynski et Chiu (1995) ont ainsi montré une baisse d'activité des rats exposés au playback d'USV (inhibition des comportements d'exploration du haut-parleur jouant les USV par exemple) et la mise en place de réponses de peur incluant même du freezing et de l'évitement (Sadananda et al., 2008). Ce playback des USV entraine parfois l'émission de vocalisations par le receveur lui-même (Blanchard et al. 1990; Beckett et al. 1997). Ces études suggèrent que ces vocalisations ont une signification comportementale pour les animaux receveurs. De plus, toujours dans le cas de l'exposition de rats à un playback d'USV à 22kHz, on constate chez eux une augmentation de la protéine Fos (un indice d'activation neuronale) dans le cortex perirhinal, l'amygdale, le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus et la substance grise périaqueducale (Beckett et al. 1997; Allen et al. 2007; Sadananda et al. 2008), qui sont toutes des structures impliquées dans la régulation de l'anxiété et de la peur (Keifer et al., 2015).

Les différents travaux sur cette question ont cependant abouti à des résultats parfois opposés (pour revue, voir Wöhr et Schwarting, 2013), et il est encore prématuré de tirer une conclusion ferme sur le rôle que les USV 22kHz peuvent jouer en tant que signaux d'alarme.

2. USV 50kHz : vocalisations de plaisir

Les USV à 50kHz sont beaucoup plus courts que ceux à 22kHz, ils ont une durée comprise entre 30 et 40ms en moyenne et une fréquence qui peut osciller entre 35 et 80kHz. Dans ce type d'USV, on peut là encore rencontrer différents sous type : des USV à 50kHz dont la fréquence est monotone et des USV à fréquence modulée (Burgdorf et al., 2007 ; Wöhr et al., 2008).

Les USV à 50kHz semblent refléter un état émotionnel positif qui pourrait s'apparenter à de la joie chez l'homme. En effet, ils sont émis dans des situations plaisantes pour l'animal, comme le jeu (Knutson et al. 1998; Webber et al. 2012), la prise de nourriture (Takahashi et al. 2010; Wöhr et al. 2008; Buck et al. 2013), l'accouplement (Sales 1972b), ou encore l'administration de drogues comme les amphétamines (Burgdorf et al. 2001). Cette hypothèse a été confortée par le fait que l'injection d'agonistes dopaminergiques (comme l'amphétamine ou la cocaïne) augmente la production d'USV à 50kHz. Panksepp et Burgdorf (2000) ont utilisé un protocole de chatouilles réalisées par l'expérimentateur sur les animaux, pour mimer le jeu. Ils ont observé que les animaux ainsi chatouillés émettaient des USV à 50kHz, et suivaient la main de l'expérimentateur, ce qui suggère que cette expérience était gratifiante pour eux. Panksepp a par la suite proposé que ces vocalisations à 50kHz étaient l'homologue du rire chez l'homme (Panksepp, 2005). On peut relever que, contrairement aux USV à 22kHz, les USV à 50Hz sont typiquement produit lors de la locomotion.

Par ailleurs, on peut noter que ces USV ne se retrouvent pas uniquement dans des situations plaisantes mais aussi dans l'anticipation de ce type de situation. Par exemple, les rats émettent ces vocalisations lorsqu'ils pénètrent dans un environnement où se trouvaient précédemment d'autres rats, marquant ainsi l'anticipation de contact sociaux amicaux avec d'autre individus (Brudzynski et Pniak, 2002).

En ce qui concerne le rôle des vocalisations à 50kHz dans la communication au sein de l'espèce, Panksepp et al. (2002) ont montré que les rats passent plus de temps avec les congénères qui émettent beaucoup d'USV à 50kHz que ceux qui en émettent moins. Cela suggère que ces vocalisations peuvent servir à maintenir le contact entre individus d'une même espèce (Lopuch et Popick, 2011). Comme pour les USV à 22kHz, des expériences de playback ont été réalisées avec des USV à 50kHz. Elles ont montré que le playback de ces vocalisations induit un comportement d'approche du haut-parleur ainsi que l'émission d'USV à 50kHz par l'animal receveur (Wöhr et Schwarting, 2007). Une étude originale a montré que des rats entrainés à appuyer sur un levier (conditionnement opérant) pour générer la production d'USV à 50kHz par un haut-parleur montraient des niveaux important d'autostimulation (Burgdorf et al., 2008), suggérant que ce signal a bien une valeur de renforcement pour celui qui le reçoit.

D'autre part, les rats exposés au playback d'USV 50kHz présentent une augmentation de la protéine Fos dans le cortex frontal et moteur, ainsi que dans le noyau accumbens (Sadanada et al., 2008) mais une diminution de l'activité de l'amygdale (Parsana et al., 2012a). Ces structures sont toutes impliquées dans les comportements appétitifs et dans le circuit de la récompense. Une libération phasique de dopamine est également observée dans le noyau accumbens chez les rats entendant ce type d'USV (Willuhn et al., 2014), ce qui est en accord avec la valeur de récompense des USV pour le receveur.

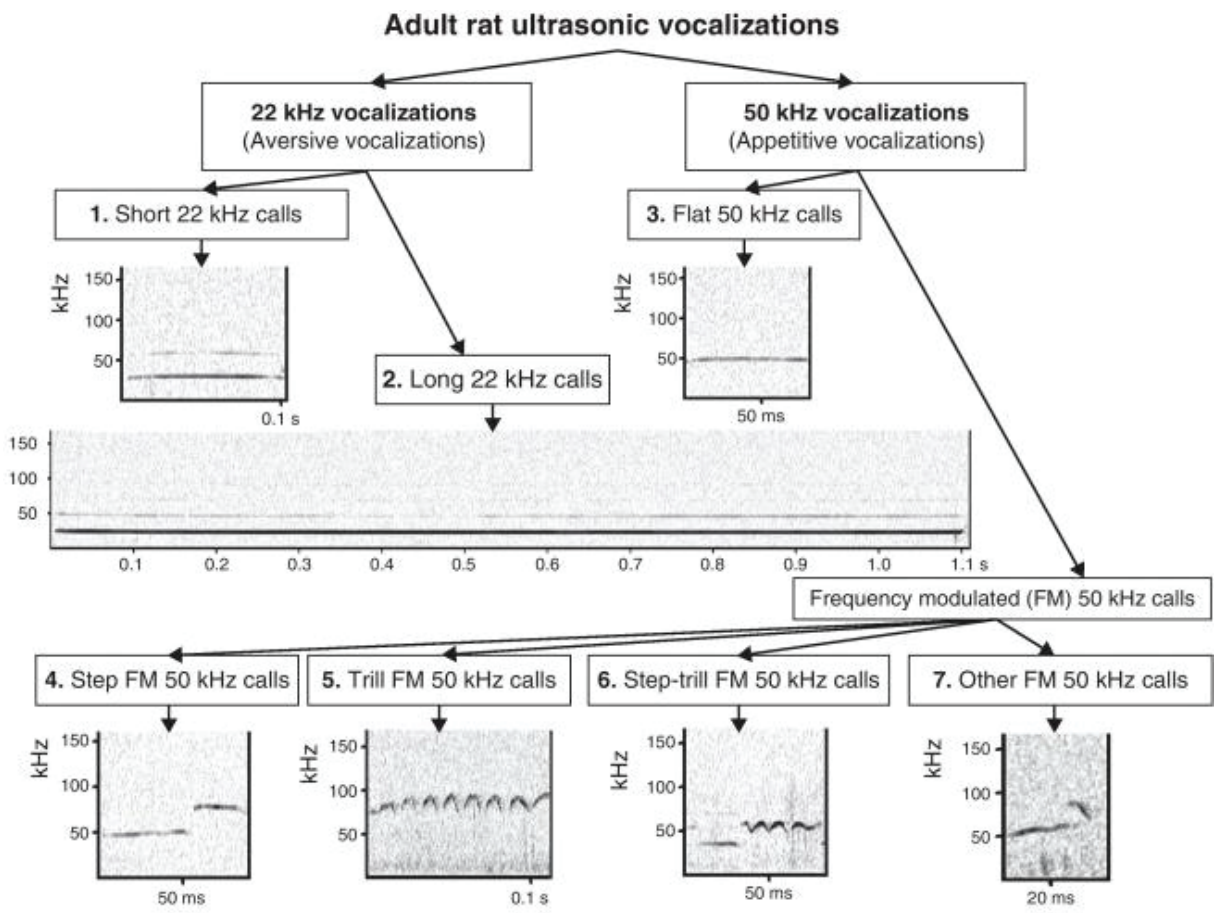


Figure 39 : *Classification des USV du rat adulte selon Brudzynski (2013). Exemples de sonogrammes des vocalisations de 22 kHz (courtes 1 et longues 2) et 50 kHz sans modulation de fréquence (3), ou modulées en fréquence sous forme de marche (4), de trille (5), d'une combinaison marche-trille (6) ou autre (7).*

IV. Le circuit impliqué dans l'initiation des USV

1. Les structures clés

L'émission de vocalisations au sens large nécessite la coordination de la phonation, de l'articulation et de la respiration, et repose de ce fait sur un vaste réseau cérébral qui s'étend des régions frontales au tronc cérébral (Jürgens, 2002). Une région clé de ce réseau est la substance grise périaqueducale (PAG) qui constitue une étape obligatoire dans le contrôle vocal chez les primates, les chats et les rongeurs (Jürgens, 1994). En effet la stimulation bilatérale ou l'inactivation de cette structure entraîne le mutisme et à l'inverse son activation électrique ou chimique déclenche des vocalisations. Cependant la PAG est impliquée dans de nombreuses fonctions incluant la nociception, les comportements de défense et la régulation autonome (Tovote et al, 2016 ; Carrive, 1993 ; Dielenberg et al, 2004 ; Holstege, 2014). Il est de ce fait difficile d'étudier son rôle dans une fonction unique comme le contrôle vocal. Dans une étude très récente, Tschida et al (2019) ont pu contourner ce problème en utilisant la technique d'optogénétique pour manipuler de façon sélective l'activité des neurones de la PAG qui sont actifs chez des souris mâles lorsqu'elles émettent des USV sociaux en présence

de femelles (« courtship USV »). L'inhibition de ces neurones empêche l'émission d'USV par les mâles et diminue leur attractivité auprès des femelles. A l'inverse, l'activation de ces neurones déclenche l'émission d'USV par les mâles, même en l'absence de femelles à proximité. Ces résultats montrent qu'il existe une population dédiée de neurones de la PAG qui sont à l'origine d'un circuit descendant (via le noyau retroambiguus impliqué dans la coordination vocale-respiratoire) nécessaire et suffisant pour l'émission d'USV.

Une autre structure impliquée dans le réseau du contrôle vocal chez le Singe et l'Homme est le cortex cingulaire antérieur (Jürgens, 1994, 2002). Peu d'études se sont intéressées à cette question chez le rongeur. Cependant dans une étude récente, Bennet et al (2019) ont appliqué des microstimulations dans le cortex cingulaire et le cortex préfrontal médian de rats éveillés maintenus tête fixe. Les auteurs ont observé que les aires dont la stimulation était la plus efficace pour induire des USV sont le cortex prélimbique postérieur et l'aire cingulaire 2. Le cortex prélimbique postérieur envoie via la PAG, des projections sur les noyaux du tronc cérébral impliqués dans les vocalisations, comme le noyau retroambiguus et la formation réticulée intermédiaire.

2. Les neuromodulateurs

Les deux types de vocalisations que nous avons décrit précédemment (22kHz et 50kHz) n'impliquent pas les mêmes systèmes de neuromodulateurs (Brudzynski, 2013). Les USV à 22kHz, impliqués dans des situations aversives, sembleraient être modulés par le système cholinergique alors que les USV à 50kHz, émis plutôt dans des situations gratifiantes, positives, seraient liés au système dopaminergique (Figure 40). Ceci est cohérent avec ce que l'on connait des circuits neuronaux de l'aversion et de la récompense (Brudzynski et al., 2015).

a. USV 22kHz : implication du système cholinergique

Ces USV seraient initiés principalement par l'activité du système cholinergique mesolimbique ascendant qui part du noyau tegmental laterodorsal (pour revue voir Brudzynski, 2013). Ce système est impliqué dans l'initiation et l'expression d'états émotionnels négatifs. Le noyau tegmental laterodorsal se projette sur l'aire pré-optique latérale, l'aire hypothalamique antérieure et sur le septum latéral. L'injection intracérébrale de carbachol, un agoniste cholinergique non sélectif, dans le noyau tegmental laterodorsal ou dans les aires sur lesquelles il se projette, stimule l'émission d'USV 22kHz (Brudzynski, 2001). Cet effet est diminué lorsque l'on injecte un antagoniste cholinergique muscarinique comme la scopolamine. Ces USV peuvent également être initiés par une injection de glutamate, un acide aminé excitateur, au niveau du noyau tegmental laterodorsal. Là encore, cet effet est atténué par l'injection de scopolamine. La durée de ces USV peut être modulée par la quantité d'agoniste qui est injectée. L'intensité de la stimulation cholinergique permet donc de contrôler l'émission de vocalisations à 22 kHz courtes ou longues. Brudzynski et al (2011) ont étudié l'activité des neurones cholinergiques du identifié les neurones cholinergiques du noyau tegmental laterodorsal en utilisant un double marquage histochimique pour la choline

acetyl transferase (marqueur des neurones cholinergiques) d'une part et pour la protéine c-Fos (marqueur d'activité métabolique) d'autre part. Ils ont montré que l'émission d'USV à 22kHz était accompagnée de l'augmentation d'activité d'une petite population de neurones cholinergiques dans ce noyau. Ces neurones contribueraient donc à la genèse d'un état émotionnel négatif et à la production d'USV 22kHz vraisemblablement par le biais de la libération d'acétylcholine dans les aires de projections.

b. USV 50kHz : implication du système dopaminergique

Les USV à 50kHz sont contrôlées par le système dopaminergique mesolimbique ascendant prenant origine dans l'aire tegmentale ventrale qui envoie des projections sur le noyau accumbens, le septum et certaines parties du cortex. Ainsi, la stimulation de l'aire tegmentale ventrale augmente le nombre d'USV 50kHz émis et à l'inverse l'injection d'antagoniste des récepteurs dopaminergiques dans cette région diminue leur nombre (Burgdorf et al, 2007).

L'injection d'agonistes dopaminergiques, comme par exemple les amphétamines, dans le noyau accumbens induit l'émission d'USV à 50kHz (Burgdorf et al. 2001a). Cet effet est dose-dépendant et est bloqué par l'application d'antagonistes dopaminergiques de type D1 ou D2 comme le raclopride (Thompson et al, 2006). Brudzynski (2013) fait donc l'hypothèse que les neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale contribuent à l'induction d'un état émotionnel positif et à la production d'USV 50kHz principalement via la libération de dopamine au niveau du noyau accumbens.

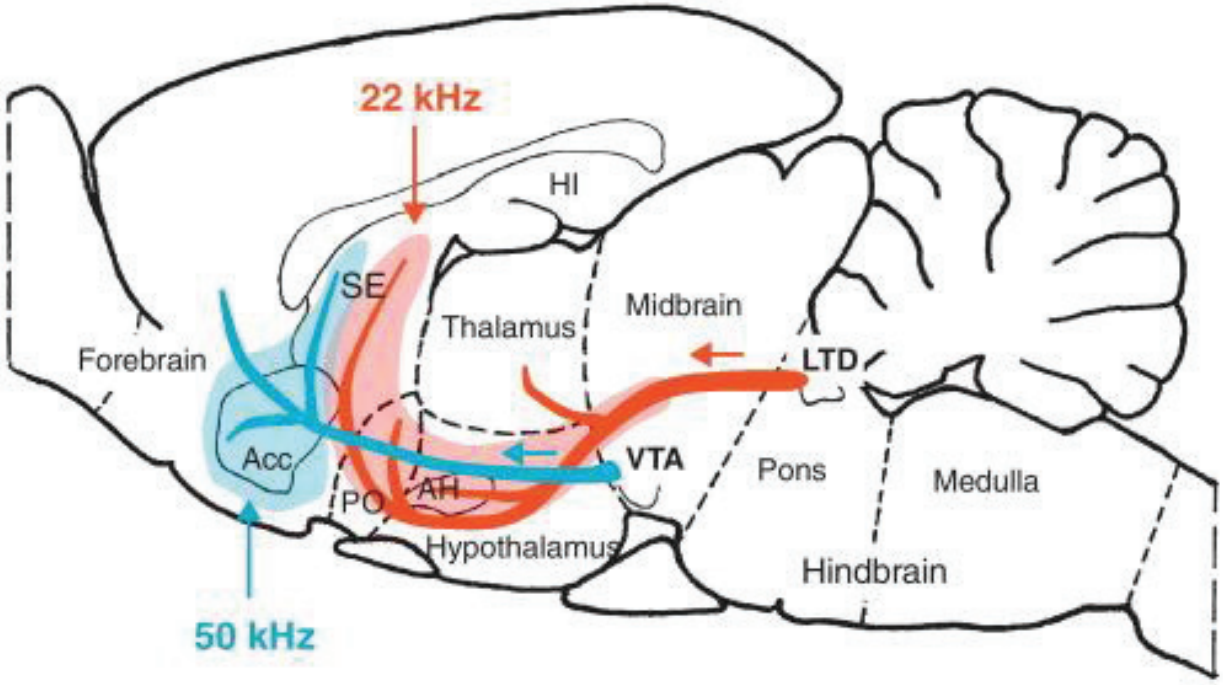


Figure 40 *: Section para-sagittale d'un cerveau de rat montrant les systèmes cholinergique (rouge) et dopaminergique (bleu) contrôlant l'émission de vocalisations de 22 et 50 kHz respectivement. Acc : noyau accumbens ; AH : aire hypothalamique antérieure ; LTD : noyau latérodorsal du tegmentum ; PO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

En conclusion les rats adultes émettent donc deux grands types de vocalisations caractérisées par des bandes de fréquence différentes. Ces deux types de vocalisations sont émis dans des contextes émotionnels opposés : les vocalisations à 22 kHz sont associées à des états émotionnels négatifs, modulées par le système cholinergique et pourraient jouer le rôle de signal d'alarme, alors que celles à 50 kHz sont associées à des états émotionnels plutôt positifs, modulées par le système dopaminergique et pourraient renforcer le lien social au sein d'une espèce.

Dans l'étude 1 nous nous sommes intéressées aux USV 22KHz qui sont classiquement observés pendant le conditionnement de peur. Nous avons analysé le contenu oscillatoire des signaux LFP recueillis dans trois structures impliquées dans le conditionnement de peur au son : la BLA, le mPFC et le cortex piriforme (PIR), lorsque l'animal émettait des USV 22KHz.

• **Cette étude a fait l'objet de la publication suivante** :
Dupin M, Garcia S, Boulanger-Bertolus J, Buonviso N, Mouly AM.
New Insights from 22-kHz Ultrasonic Vocalizations to Characterize Fear Responses: Relationship with Respiration and Brain Oscillatory Dynamics.
eNeuro. 2019 May 7;6(2). pii: ENEURO.0065-19.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0065-19.2019.

• **Cet article a fait l'objet d'un Research Highlight par la revue eNeuro** (Annexe 1):
Ultrasonic Vocalizations Emitted during Defensive Behavior Alter the Influence of the Respiratory Rhythm on Brain Oscillatory Dynamics in the Fear Circuit of Rats
Rosalind S.E. Carney, DPhil.

• Nous avons également été sollicitées pour écrire un **Research Article Summary** pour le Blog Neuronline du site de la SfN (Annexe 2) :

https://neuronline.sfn.org/scientific-research/what-happens-to-neural-dynamics-when-a-rat-emits-ultrasonic-vocalizations

Publication 1

eNeuro

New Research

Cognition and Behavior

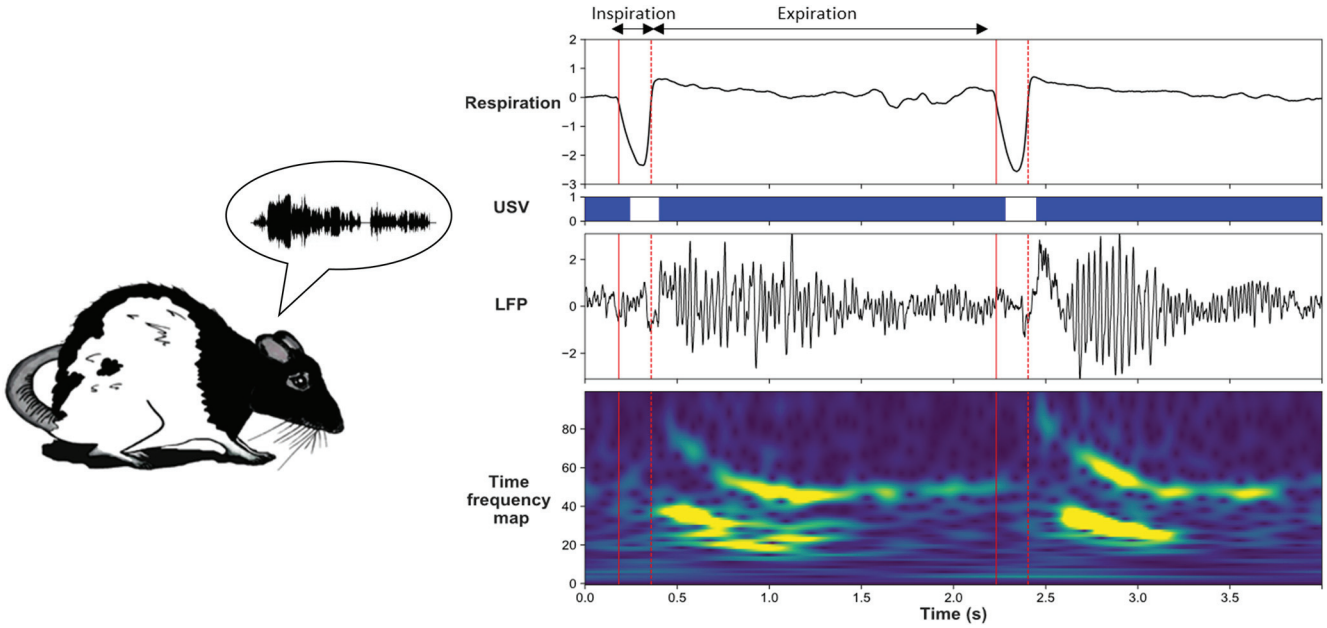
New Insights from 22-kHz Ultrasonic Vocalizations to Characterize Fear Responses: Relationship with Respiration and Brain Oscillatory Dynamics

Maryne Dupin,[1] Samuel Garcia,[1] Julie Boulanger-Bertolus,[1] Nathalie Buonviso,[1] and Anne-Marie Mouly[1]

https://doi.org/10.1523/ENEURO.0065-19.2019

[1]Lyon Neuroscience Research Center, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1028, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5292, University Lyon 1, Lyon 69366, France

Visual Abstract



Significance Statement

While freezing is the most frequently used measure of fear, it is only one among the different components of rodents' response to threatening events. Ultrasonic vocalization (USV) is another index that gives additional insight into the socioemotional status of an individual. Our study is the first to describe the effects of USV production on rat's brain oscillatory activities in the fear neural network, and to relate some of them to changes in nasal breathing. A better knowledge of the impact of social vocalizations on brain neural dynamics is not only important for understanding the respective weight of the different components of fear response, but is also particularly relevant for rodent models of human neuropsychiatric disorders, for which socio-affective communication is severely impaired.

Fear behavior depends on interactions between the medial prefrontal cortex (mPFC) and the basolateral amygdala (BLA), and the expression of fear involves synchronized activity in θ and γ oscillatory activities. In addition, freezing, the most classical measure of fear response in rodents, temporally coincides with the development of sustained 4-Hz oscillations in prefrontal-amygdala circuits. Interestingly, these oscillations were recently shown to depend on the animal's respiratory rhythm, supporting the growing body of evidence pinpointing the influence of nasal breathing on brain rhythms. During fearful states, rats also emit 22-kHz ultrasonic vocalizations (USVs) which drastically affect respiratory rhythm. However, the relationship between 22-kHz USV, respiration, and brain oscillatory activities is still unknown. Yet such information is crucial for a comprehensive understanding of how the different components of fear response collectively modulate rat's brain neural dynamics. Here, we trained male rats in an odor fear conditioning task, while recording simultaneously local field potentials (LFPs) in BLA, mPFC, and olfactory piriform cortex (PIR), together with USV calls and respiration. We show that USV calls coincide with an increase in delta and gamma power and a decrease in theta power. In addition, during USV emission in contrast to silent freezing, there is no coupling between respiratory rate and delta frequency, and the modulation of fast oscillations amplitude relative to the phase of respiration is modified. We propose that sequences of USV calls could result in a differential gating of information within the network of structures sustaining fear behavior, thus potentially modulating fear expression/memory.

Key words: fear response; oscillations; piriform cortex; prefrontal cortex; respiration; ultrasonic vocalizations

Introduction

Fear behavior has been shown to depend on the interaction between the median prefrontal cortex (mPFC) and the basolateral amygdala (BLA), and to involve synchronized activity in theta (4–12 Hz) and gamma (30–120 Hz) frequency oscillations (Seidenbecher et al., 2003; Popa et al., 2010; Headley and Paré, 2013; Herry and Johansen, 2014; Likhtik et al., 2014; Stujenske et al., 2014; Bocchio et al., 2017). In addition, recent studies have shown that freezing, the most used index of fear response in rodents, temporally coincides with the development of sustained 4-Hz oscillations causally involved in the synchronization of spiking activity between prelimbic mPFC and amygdala (Dejean et al., 2016; Karalis et al., 2016). Importantly, this slow oscillation is distinct from the theta rhythm and predicts the onset and offset of freezing. Interestingly, recent work has shown that freezing-related 4-Hz oscillation in the prelimbic mPFC was correlated with the animal's respiratory rate, and that disruption of olfactory inputs to the mPFC significantly reduces the 4-Hz oscillation in this structure (Moberly et al., 2018). These data bring further support to the growing body of evidence showing that in addition to its impact on olfactory regions (for review, see Buonviso et al., 2006), nasal respiration also entrains oscillations in widespread brain regions including those involved in the fear network like the mPFC and amygdala (for review, see Tort et al., 2018a). This suggests that the breathing rhythm, akin to slow oscillatory rhythms, could help coordinate neural activity across distant brain regions (Jensen and Colgin, 2007; Heck et al., 2017), and potentially modulate emotional/cognitive processes.

Freezing is only one among the different components of rodents' response to a threatening event. In aversive situations, such as exposure to predator or foot-shock, rats also emit 22-kHz ultrasonic vocalizations (USVs; Schwarting and Wöhr, 2012). They indicate a negative emotional state and are associated with the termination of social behavior and the avoidance of social contacts. Their study provides a powerful tool to assess emotionality and social behavior in animal models of pathologies like autism (Wöhr and Scattoni, 2013). Surprisingly, to our knowledge no study has assessed the impact of USV production on the animal's brain neural dynamics. Yet such information is crucial to understand how the different components of fear response collectively modulate rat's brain neural dynamics. Indeed the emission of USV is considered as reflecting a change in emotional level and 22-kHz USV rates increase with the aversiveness of the situation, as evidenced when foot-shock intensity is increased (Wöhr et al., 2005; Hegoburu et al., 2011). Importantly, 22-kHz USV emission drastically slows down the animal's respiratory rate (Frysztak and Neafsey, 1991; Hegoburu et al., 2011; Sirotin et al., 2014; Boulanger-Bertolus et al., 2017), potentially disrupting the respiratory-related brain rhythm described above. The present study thus aimed (1) to investigate whether USV emission coincides with

Received February 22, 2019; accepted February 23, 2019; First published April 8, 2019.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: M.D. and A.-M.M. performed research; M.D., S.G., J.B.-B., N.B., and A.-M.M. analyzed data; M.D., N.B., and A.-M.M. wrote the paper; A.-M.M. designed research.

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the LABEX CORTEX (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency.

J. Boulanger-Bertolus's present address: Center for Consciousness Science, Department of Anesthesiology, University of Michigan, Ann Arbor, MI48109.

Acknowledgements: We thank Belkacem Messaoudi and Marc Thevenet for technical assistance, Emmanuelle Courtiol and Rémi Gervais for very valuable discussions of the data and careful reading of this manuscript, and Ounsa Ben-Hellal for taking care of the animals.

Correspondence should be addressed to Maryne Dupin at maryne.dupin@inserm.fr or Anne-Marie Mouly at annemarie.mouly@cnrs.fr

https://doi.org/10.1523/ENEURO.0065-19.2019

Copyright © 2019 Dupin et al.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

specific changes in oscillatory activities in the fear neural network, and (2) to assess to what extent these changes are related to changes in respiratory rate.

To do so, rats were trained in an odor fear conditioning paradigm while local field potentials (LFPs) in BLA, mPFC, and olfactory piriform cortex (PIR) were monitored simultaneously with USV calls, behavior and respiration, during the post-shock period. BLA and mPFC were chosen for their well-known role in learned fear acquisition and expression (LeDoux, 2000; Corcoran and Quirk, 2007). The PIR was included as a recording site because it is involved in odor fear conditioning (Sevelinges et al., 2004; Hegoburu et al., 2009, 2014; Sacco and Sacchetti, 2010) and establishes direct connections with both the PFC (Clugnet and Price, 1987) and the amygdala (McDonald, 1998). We report that USV emission temporally coincides with a significant increase in delta, beta, and gamma activities while a decrease in theta activity is observed. In addition, we show that some of these changes co-occur with USV-induced changes in respiration. The present data suggest that USV calls could result in a differential gating of information within the fear neural network, thus potentially modulating fear memory/expression.

Materials and Methods

Animals

Data were obtained from twenty-two male Long Evans rats (250–270 g at their arrival, Janvier Labs). They were housed individually at 23°C and maintained under a 12/12 h light/dark cycle (lights on from 8 A.M. to 8 P.M.). Food and water were available ad libitum. All experiments and surgical procedures were conducted in strict accordance with the European Community Council Directive of September 22, 2010 (2010/63/UE) and the national ethics committee (APAFIS#10606). Care was taken at all stages to minimize stress and discomfort to the animals.

Surgery

Animals were anesthetized with Equithesin, a mixture of chloral hydrate (127 mg/kg, i.p.) and sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.p.), and placed in a stereotaxic frame (Narishige) in a flat skull position. The level of anesthesia was held constant with regular injections of Equithesin throughout the experiment. Monopolar stainless steel recording electrodes (100 μm in diameter) were then stereotaxically implanted in the left hemisphere in the three brain areas: PIR (AP: –1.8 mm, L: +5.5 mm, DV: –8 mm), mPFC (AP: +3.0 mm; L: +0.8 mm; DV: –3.5 mm), and BLA (AP: –2.8 mm, L: +4.9 mm, DV: –7.5 mm). Accurate positioning in the PIR was achieved using the characteristic profiles of evoked field potential induced in the PIR in response to electrical stimulation of the olfactory bulb (Haberly, 1973). For this, a bipolar stimulation electrode (made of two 100-μm stainless-steel wires with a tip separation of 500 μm) was lowered transiently in the olfactory bulb to facilitate positioning in the PIR and withdrawn thereafter. A reference electrode was screwed in the skull above the right parietal lobe. The three recording electrodes were connected to a telemetry transmitter (rodentPACK system, EMKA Technologies) fixed to the rat's skull surface by dental acrylic cement and anchored with a surgical screw placed in the frontal bone. The animals were allowed to recover for two weeks following surgery.

Experimental apparatus

The apparatus has been described in detail in a previous study (Hegoburu et al., 2011). It consisted of a whole-body customized plethysmograph (diameter 20 cm, height 30 cm, EMKA Technologies) placed in a sound-attenuating cage (length, 60 cm; width, 60 cm; height, 70 cm, 56-dB background noise). The plethysmograph was used to measure respiratory parameters in behaving animals. The ceiling of the plethysmograph was equipped with a tower allowing the introduction of a condenser ultrasound microphone (Avisoft-Bioacoustics CM16/CMPA) to monitor USVs emitted by the rats. The bottom of the animal chamber was equipped with a shock floor connected to a programmable Coulbourn shocker (Bilaney Consultants GmbH). Three Tygon tubing connected to a programmable custom olfactometer were inserted in the tower on the top of the plethysmograph to deliver air and odorants. Deodorized air flowed constantly through the cage (2 l/min). When programmed, an odor (McCormick Pure Peppermint; 2 l/min; 1:10 peppermint vapor to air) was introduced smoothly in the air stream through the switching of a solenoid valve (fluid automation systems, CH-1290 Versoix), thus minimizing its effect on change in pressure. The bottom of the animal chamber had a port connected to a ventilation pump which could draw air out of the plethysmograph (at a rate of up to 2 l/min) thus maintaining a constant airflow that did not interact with the animal's breathing pattern. Animal's behavior was monitored with two video cameras on the walls of the sound-attenuating cage.

Fear conditioning paradigm and data acquisition

After the recovery period, the animals were handled individually and placed in the experimental apparatus for 30 min each day during 3–4 d before the beginning of the experiments to familiarize them with being manipulated and connected to the telemetry transmitter.

For the conditioning session, the telemetry transmitter was plugged on the animal's head and the rat was allowed free exploration during the first 4 min, then an odor was introduced into the cage for 20 or 30 s, the last second of which overlapped with the delivery of a 0.4-mA foot-shock. The animal received 10 odor-shock trials, with an intertrial interval of 4 min. After the last pairing, the transmitter was unplugged and the animal returned to its home cage.

Retention test

The conditioned fear response was assessed during a retention test conducted 48 h after conditioning. For the retention test, the rat was placed in the experimental cage (equipped with new visual cues and with a plastic floor to avoid contextual fear expression) and allowed a 4-min odor-free period. The CS odor was then presented five times for 20 s with a 4-min intertrial interval. The animal's freezing response was quantified

during each 20-s odor presentation and averaged across the five trials.

Data acquisition and preprocessing

For USV recording, the ultrasound microphone was connected to a recording interface (UltraSoundGate 116 Hb, Avisoft-Bioacoustics) with the following settings: sampling rate = 214,285 Hz; format = 16 bit (Wöhr et al., 2005). Recordings were transferred to Avisoft SASLab Pro (version 4.2, Avisoft-Bioacoustics) and a fast Fourier transform (FFT) was conducted. Spectrograms were generated with an FFT length of 512 points and a time window overlap of 87.5% (100% Frame, FlatTop window). These parameters produced a spectrogram at a frequency resolution of 419 Hz and a time resolution of 0.29 ms. The acoustic signal detection was provided by an automatic whistle tracking algorithm with a threshold of −20 dB, a minimum duration of 0.01 s and a hold time of 0.02 s. However, the accuracy of detection was verified trial by trial by an experienced user. The main parameters used in the present study were extracted using Avisoft SASLab Pro and concerned the duration as well as the peak amplitude and peak frequency of USV calls. No band pass filter has been applied during USV recording. Although a few 50-kHz USVs were observed following shock delivery, in the present study, we focused on 22-kHz USV.

The respiratory signal collected from the plethysmograph was amplified and sent to an acquisition card (MC-1608FS, Measurement Computing; sampling rate = 1000 Hz) for storage and offline analysis. The detection of the respiratory cycles was achieved using an algorithm described in a previous study (Roux et al., 2007). This algorithm performs two main operations: signal smoothing for noise reduction, and detection of zero-crossing points to define accurately the inspiration and expiration phase starting points. Momentary respiratory frequency was determined as the inverse of the respiratory cycle (inspiration plus expiration) duration.

The video signals collected through the two cameras were transmitted to a video acquisition card and a homemade acquisition software. Offline, freezing behavior defined as the absence of any visible movement except that due to breathing (Blanchard and Blanchard, 1969), was automatically detected using a Labview homemade software and further verified by an experimenter. For this, on each video recording, two successive images were subtracted and the resulting image was binarized using a gray level threshold. The pixels below this threshold were encoded in black and those above the threshold in white. The absence of white pixels on the image resulted in the scoring of freezing state. Then the same analysis was conducted for the next images of the video recording. The animal's freezing behavior was thus analyzed with a 40-ms (two consecutive images) time bin. As a final step, in accordance with classical encoding of freezing behavior in the literature, only freezing episodes lasting longer than 1 s were considered as stable freezing behavior. Behaviors other than freezing were manually checked and classified. Escape attempt was scored when the animal exhibited wall climbing, running, or saccadic head movements. Although the latter do not involve directed locomotion due to the small size of the plethysmograph, they are clearly different from active exploratory behavior. They might have been induced by the small size of our cage and the absence of any escape route.

LFPs were collected by telemetry via a three-channel wireless miniature transmitter (<5.2 g, RodentPack EMKA Technology). LFP signals were amplified (1000×), filtered (between 0.1 and 100 Hz), digitized (sampling frequency = 1000 Hz), and stored on a computer for offline analysis.

Data analysis

Data selection and experimental categories

Since the aim of the study was to assess the relationship between USV emission, respiration, and brain oscillatory activity, we focused our analysis on the 1-min period following shock delivery during which USVs were numerous and loud. During this period, the animal's behavior was of two types: freezing or escape attempt. No other type of behavior (like grooming, exploration, quiet immobility. . .) was observed. We first noticed that while the majority of USVs were emitted during freezing, a substantial amount of USV also occurred during escape behavior. This led us to distinguish four types of experimental categories: silent freezing, USV freezing, silent escape, and USV escape (Fig. 1). For each category, only segments longer than 1 s were considered for further analysis.

LFP signals spectral analysis

The different data (respiration, USV, behavior, LFP signals) were synchronized offline via a TTL synchronization signal generated at the beginning of each experimental session. Once synchronized, the data were analyzed using custom-written scripts under Python.

The LFP signals were first individually inspected to eliminate artifacts due to signal saturation or transient signal loss. The selection was made for each recording site separately and proceeded as follows: when the duration of an artifact exceeded 5 s over the 60-s post-shock recording, the trial was excluded. When the number of excluded trials exceeded five (out of the 10 trials), then the recording site was excluded for this animal. This procedure led to the following number of animals per recording site for all the electrophysiological data: BLA, $n = 14$; CPF, $n = 21$; PIR, $n = 20$. Because the average duration of individual USV calls was too short to allow proper oscillatory activity analysis (notably for the slow oscillations), we conducted the analysis on blocks of USV corresponding to successive USV with less than 1 s between each other (Fig. 1). As soon as the interval between two USV exceeded 1 s, then a new block was defined. The periods between USV blocks are considered as silent periods.

The power spectral density (PSD) of the LFP signals was calculated using the continuous Morlet wavelet transform (Kronland-Martinet et al., 1987) instead of the classical windowed Fourier transform. Indeed, the continuous wavelet transform is less susceptible to non-stationary events and offers a better time–frequency resolution. The

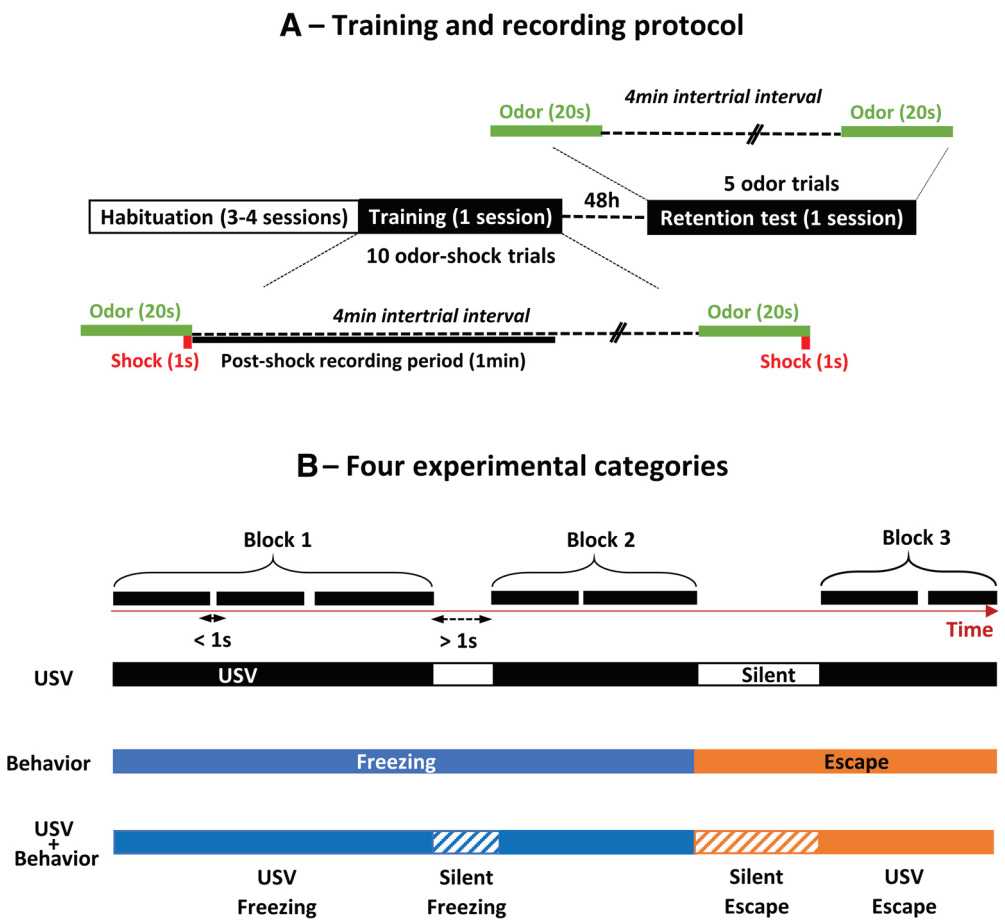


Figure 1. ***A***, Training and recording protocol. The animals were trained with 10 odor (20 s)-shock (1 s) pairings. During the 1-min post-shock period, LFPs were recorded together with USVs and behavior; 48 h later, a retention test was conducted using five odor (20 s) presentations during which the animal's freezing response was assessed. ***B***, Definition of four experimental categories for data analysis. During the 1-min post-shock period, we defined blocks of USV corresponding to successive USV with less than 1 s between each other. When the interval between two USV exceeded 1 s, then a new block was defined (first row). The periods between USV blocks are considered as silent periods. In parallel, the synchronized animal's behavior (freezing or escape) was detected, and four different combinations were obtained: USV freezing, USV escape, silent freezing, and silent escape. For each combination, only segments longer than 1 s were considered.

Morlet wavelet estimated the amplitude of the signal at each time and frequency bin. The obtained time frequency map was then segmented in periods of interest with variable durations (corresponding to the four above defined experimental categories) and averaged per category. Four frequency bands were identified for the subsequent analyses: delta (0–5 Hz), theta (5–15 Hz), beta (15–40 Hz), and gamma (40–80 Hz) and the mean power in the different frequency bands was calculated. The values obtained for each recording site were averaged across animals.

Covariation of LFP slow (delta and theta) oscillatory frequency and respiratory frequency

To study frequency-frequency coupling between LFP signals and respiration, we did not use classical coherence analysis because the respiratory signal is not always sinusoidal (especially during USV calls, see Fig. 5*A*). We therefore designed a homemade method allowing to track instantaneous frequency synchrony. To do so, for each detected respiratory cycle, the frequency was estimated as 1/cycle duration and the time course of the instantaneous respiratory frequency was extracted. In parallel, the continuous Morlet scalogram for the LFP signal was computed in our frequency band of interest (0–15 Hz). At each time bin (4 ms), the local maximum in the instantaneous power spectrum was extracted together with the corresponding instantaneous frequency of the LFP signal. The time course of the predominant instantaneous frequency curve of the LFP was then extracted. From the two times series obtained (instantaneous respiration frequency and predominant instantaneous LFP frequency), a 2D matrix histogram was built, with the respiratory frequency represented on the *x*-axis and the LFP frequency on *y*-axis. This 2D histogram was normalized so that the total sum is 1, and point density was represented on a color scale ranging from blue to yellow as the point density increases. The existence of a coupling between respiration frequency and LFP frequency can be assumed when a high point density (i.e., yellow color) is observed along the diagonal of the 2D histogram (see Fig. 6 for an illustration).

Conversely, in the absence of coupling a non-correlated Gaussian shape is observed. The two possibilities can co-occur on the same 2D histogram.

Modulation of LFP beta and gamma power by respiratory cycle phase

To investigate whether LFP beta and gamma amplitudes were modulated by respiration phase, we computed a so called "cycle-frequency scalogram" of the LFP signal (adapted from Roux et al., 2007). In analogy to a classical time-frequency map that computes the energy of LFP signal over time and frequency, we computed the energy of LFP signal over respiratory cycle duration and frequency. Briefly this method consists in three steps: (1) compute the continuous Morlet scalogram (time-frequency map), (2) use detected respiratory cycle to segment this scalogram in two phases (inhalation, exhalation), and (3) stretch by linear interpolation each segment so that all the segments fit the same normalized template (range from 0 to 1, with a 0.025 bin). The result of this analysis is very similar to the classical time frequency scalogram except that it presents small time distortions locally that do not affect the instantaneous power. Since all the cycles were normalized to the same size, they were averaged together. The typical template of an individual respiratory cycle is defined as follows: inhalation from 0 to 0.4 and exhalation from 0.4 to 1. This ratio corresponds to the average value calculated over all cycles and animals. On the scalogram, LFP signal power for the different frequency bands is represented using a color scale ranging from blue to yellow as the power increases (see Fig. 7*B* for an illustration). The maximum power in the beta and gamma bands was also extracted and represented on a curve throughout the respiratory cycle.

Statistical analysis

All analyses were performed with Systat 13.0 software. For each test, the significance level was set at $p < 0.05$.

USV parameters (Fig. 2; duration, peak amplitude, peak frequency) were compared between USV freezing and USV escape using paired *t* tests.

Average LFP oscillatory activity parameters (Figs. 3, 4; power, peak amplitude, frequency) are calculated in the different frequency bands: delta (0–5 Hz), theta (5–15 Hz), beta (15–40 Hz), and gamma (40–80 Hz), and expressed as mean ± SEM across animals. A three-way (structure, USV, and behavior) ANOVA for repeated measures was first applied to assess between structures differences in the four experimental categories defined above. Then, for each structure, a two-way (USV and behavior) ANOVA for repeated measures was applied followed by *post hoc* multiple comparisons.

The time course of beta and gamma activity power throughout the respiratory cycle (Figs. 8, 9) was first compared using a three-way ANOVA (behavior, USV, and respiratory cycle time), followed by a two-way ANOVA for repeated measures (USV and respiratory cycle time) conducted separately for freezing and escape condition.

Histology

At the end of the experiment, the animals were killed with a lethal dose of pentobarbital, their brains were removed, postfixed, and cryoprotected in sucrose (20%). The brains were then sectioned (40-μm coronal slices) for verification of electrodes tips by light microscopy. Areas targeted by the electrodes in the three implanted brain regions have been reported on brain atlas coronal sections (Extended Data Fig. 1-1).

Results

22-kHz USVs are observed during both passive and active defense responses

The 1-min period following shock delivery was analyzed for behavior, USV emission and brain oscillatory activity. During this period, the animal's behavior was of two types: freezing or escape attempts. While the majority of USVs were emitted during freezing, a non-negligible amount of USV also occurred during escape. Figure 2*A* illustrates the repartition of the four categories throughout the 1-min post-shock period. The animals spent 70.3% of the time in freezing versus 29.7% in escape. While the animals spent similar amounts of time in silent freezing compared to USV freezing, they spent more time in silent escape than in USV escape. Figure 2*B* reports the mean behavior duration in the four conditions and the mean USV rate during the 1-min post-shock period.

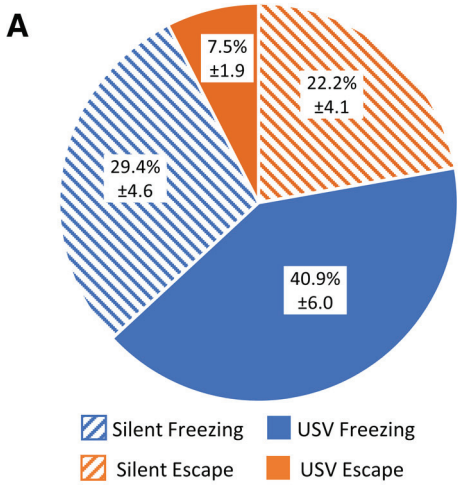
We then compared the characteristics of the USV emitted during freezing versus escape. Paired *t* test comparisons revealed that call duration (Fig. 2*C*) was significantly lower for USV emitted during escape than during freezing ($t_{(21)} = 2.198$, $p = 0.039$), while call peak amplitude (Fig. 2*D*) and peak frequency (Fig. 2*E*) was significantly higher during escape than during freezing (peak amplitude: $t_{(21)} = -3.957$, $p = 0.001$; peak frequency: $t_{(21)} = -3.928$, $p = 0.001$).

Finally, we assessed whether the amount of USV (USV freezing or USV escape) emitted during conditioning could predict the animal's performance during the retention test conducted 48 h later (Fig. 2*F*). We showed that the number of USV freezing was positively correlated with the amount of freezing at retention (Pearson correlation coefficient: $R_{22} = 0.49$, $p < 0.02$) while the number of USV escape was not ($R_{22} = 0.19$).

In summary, 22-kHz USVs are emitted during both passive (freezing) and active (escape) defense responses. USV emitted during escape are shorter and louder than those emitted during freezing, and exhibit a higher peak frequency. In addition, the amount of USV freezing during training was a good predictor of the animal's learned fear response at retention.

USV emission is associated with changes in oscillatory activity power

The main objective of this experiment was to assess whether USV emission is associated with changes in oscillatory activity power compared to the silent behavioral state, and if these changes are similar across the three recording sites. Because USVs are emitted during two different defense responses, we also compared oscillatory activity power between these two behavioral states (freezing vs escape).



B

Experimental category	Mean Behavior duration (s)/1 min	Mean USV Nb/1min
USV Freezing	24.5±3.6	16±2
Silent Freezing	17.6±2.7	
USV Escape	4.5±1.2	4±1
Silent Escape	13.3±2.4	

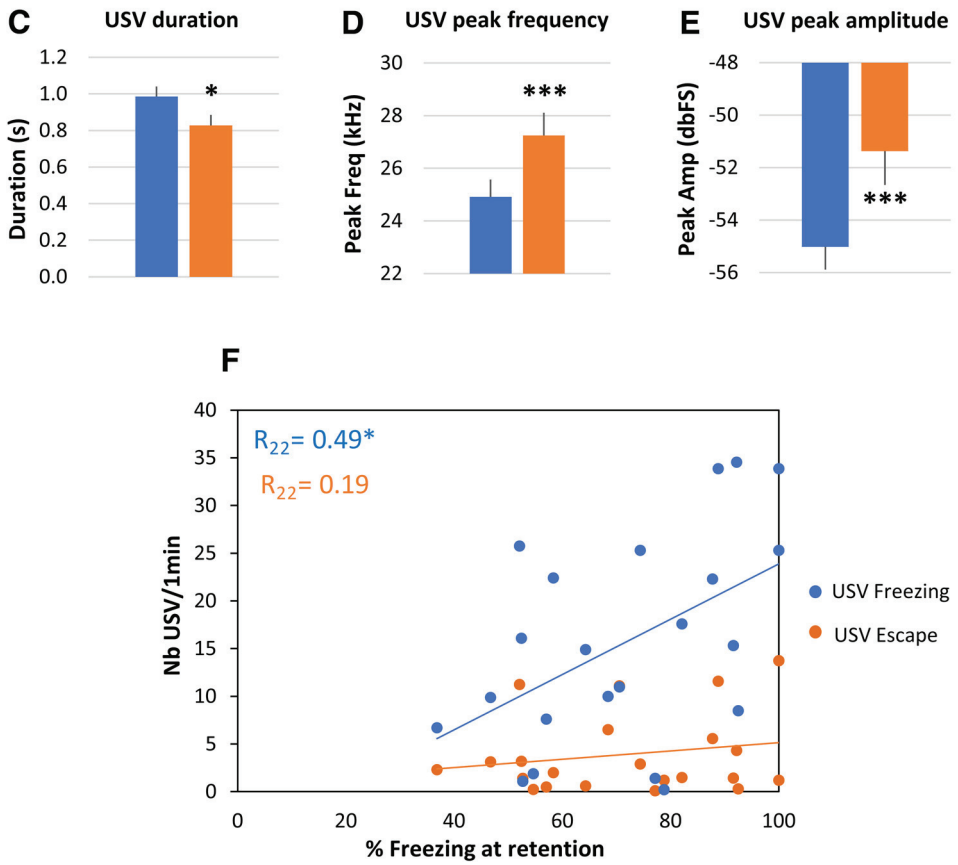


Figure 2. Repartition of the four defined categories and characterization of two 22-kHz USV types ($n = 22$ rats). ***A***, Mean (±SEM) proportion of each category per animal over the 1-min post-shock analysis period. ***B***, Mean (±SEM) duration of the different categories and mean (±SEM) number of USV freezing and USV escape emitted during the 1-min post-shock period. ***C***, Mean duration (±SEM) of the two USV subtypes. ***D***, Mean frequency (±SEM) of the two USV subtypes. ***E***, Mean intensity (±SEM) of the two USV subtypes; $n = 22$ rats, $*p < 5 \times 10^{-2}$, $***p < 5 \times 10^{-3}$. ***F***, Correlation between the mean number of USV calls recorded during the 1-min post-shock period at training and the freezing score obtained during the retention test in response to the learned odor; $*p < 5 \times 10^{-2}$.

Delta (0–5 Hz) and theta (5–15 Hz) bands mean PSD

For each recording site, LFP mean PSD was calculated per animal and averaged across animals (Fig. 3, left part). It can be observed that in each recording site, the signal power in the delta and theta bands depends both on the animal's behavioral state (freezing vs escape) and for a given behavioral state, on the emission of USV (USV vs silent). Averaged mean power was

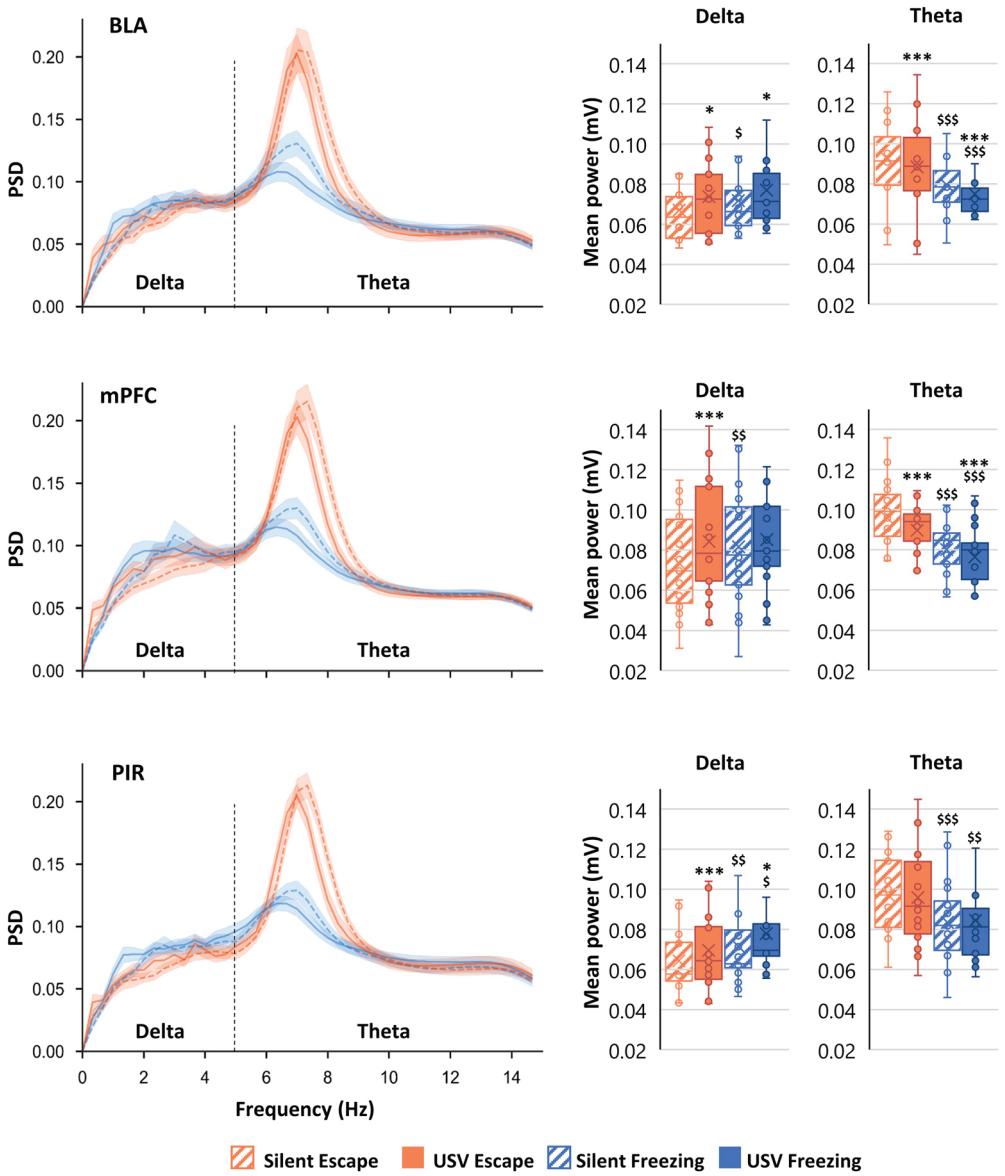


Figure 3. PSD of LFP signals and mean power in delta (0–5 Hz) and theta (5–15 Hz) bands. The average PSD (±SEM) is represented on the left part of the figure, and the delta and theta average power (±SEM) is represented on the right part. BLA: $n = 14$; mPFC: $n = 21$; and PIR: $n = 20$; $*p < 5 \times 10^{-2}$, $**p < 5 \times 10^{-3}$, $***p < 5 \times 10^{-4}$: significant difference between same color-different pattern bars; $\$p < 5 \times 10^{-2}$, $\$\$p < 5 \times 10^{-3}$, $\$\$\$p < 5 \times 10^{-4}$: significant difference between same pattern-different color bars.

calculated for each frequency band, in the four categories.

Delta Band mean power (Fig. 3, middle column)

A three-way ANOVA revealed no main effect of structure ($F_{(2,52)} = 1.38$, $p = 0.3$), but a significant USV × behavior × structure interaction ($F_{(2,52)} = 3.23$, $p = 0.05$). In each recording sites, a two-way ANOVA revealed a significant main effect of factors USV and behavior, and no significant USV × behavior interaction except for the mPFC (see Extended Data Fig. 3-1 for all the statistical results). *Post hoc* comparisons first showed that in the three structures, δ mean power was higher during silent freezing than during silent escape. In addition, in both behavioral states (except for mPFC for which the effect of USV was only significant during escape), the emission of USV was associated with a significant enhancement in delta mean power.

Theta Band mean power (Fig. 3, right column)

The three-way ANOVA revealed no main effect of structure ($F_{(2,52)} = 0.38$, $p = 0.7$), but a significant USV × structure interaction ($F_{(2,52)} = 4.72$, $p = 0.01$). In BLA and mPFC, the two-way ANOVA revealed a significant main effect of factors USV and behavior, and no significant USV × behavior interaction (Extended Data Fig. 3-1, upper part). In PIR, no significant effect of factor USV was observed. *Post hoc* comparisons (Extended Data Fig. 3-1, lower part) showed that in the three structures, theta mean power was lower during silent

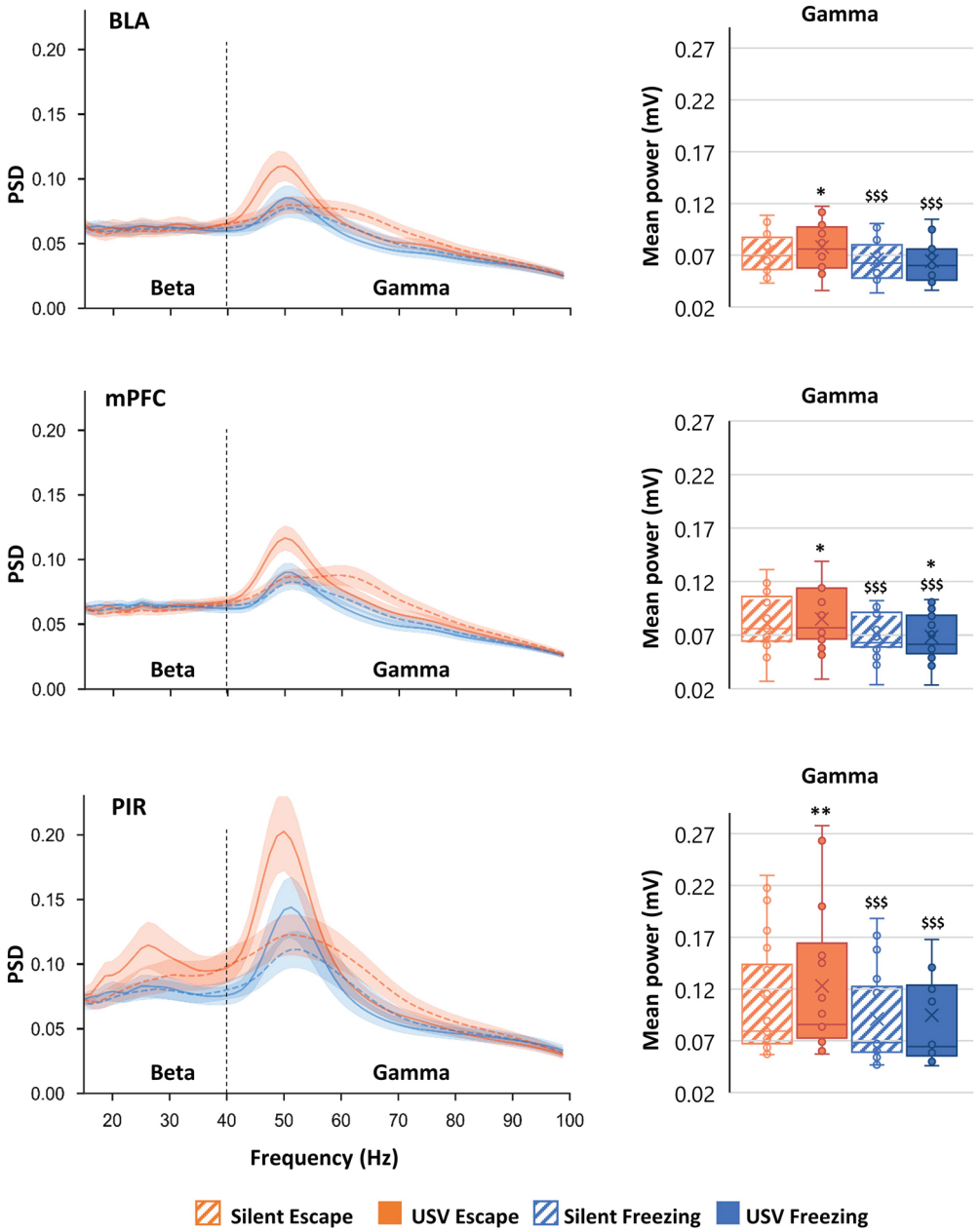


Figure 4. PSD of LFP signals and mean power in gamma (40–80 Hz) band. The average PSD (±SEM) is represented on the left part of the figure, and the gamma average power (±SEM) is represented on the right part. BLA: $n = 14$; mPFC: $n = 21$; and PIR: $n = 20$; $*p < 5 \times 10^{-2}$, $**p < 5 \times 10^{-3}$, $***p < 5 \times 10^{-4}$: significant difference between same color-different pattern bars; $\$p < 5 \times 10^{-2}$, $\$\$p < 5 \times 10^{-3}$, $\$\$\$p < 5 \times 10^{-4}$: significant difference between same pattern-different color bars.

freezing than during silent escape. Moreover, in BLA and mPFC, USV emission was associated with a decrease in theta mean power.

In summary, when compared to silent escape, silent freezing is characterized by a higher power of oscillatory activity in the delta band while a lower power was observed in the theta band. Importantly, in both freezing and escape states, the emission of USV coincides globally with an increase in power in the delta band in all three regions and a decrease in the theta band in BLA and mPFC.

Beta (15–40 Hz) and gamma (40–80 Hz) bands mean PSD

Mean PSD of LFPs is represented for each recording site in Figure 4, left part. It can be observed that in each recording site, the signal power in the gamma band depends on both the animal's behavioral state (freezing vs escape) and, for a given behavioral state, the emission of USV (USV vs silent). Furthermore, in the PIR, the signal power in the beta band also seems to be affected during the emission of USV during escape. Averaged mean power was calculated for each frequency band, in the four categories.

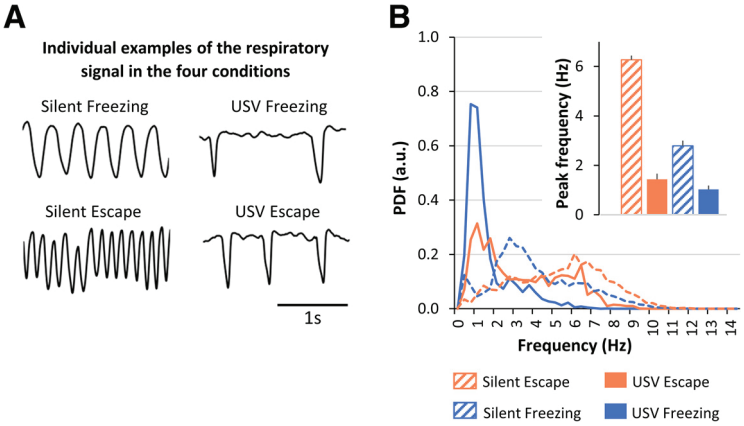


Figure 5. Characterization of respiratory frequency in the four experimental categories ($n = 22$ rats). ***A***, Individual examples of the respiratory signal. ***B***, PDF of respiratory frequency. The distributions were obtained using a 0.33-Hz bin. Inset, Average peak frequency (±SEM) in each category.

Beta Band mean power (Extended Data Fig. 4-1)

Beta Band mean power values in the three recording sites are reported on Extended Data Fig. 4-1, upper part. The three-way ANOVA revealed a significant main effect of Structure ($F_{(2,52)} = 4.24$, $p = 0.02$), and a significant interaction for USV × structure ($F_{(2,52)} = 4.10$, $p = 0.02$), behavior × structure ($F_{(2,52)} = 5.15$, $p = 0.009$) and USV × behavior × structure ($F_{(2,52)} = 5.32$, $p = 0.008$). The two-way ANOVA revealed no significant changes in beta activity in the BLA (Extended Data Fig. 4-1, middle part). In the mPFC, a significant main effect of USV was observed, and *post hoc* comparisons showed that USV emission during both Escape and Freezing induced an increase in β mean power (Extended Data Fig. 4-1, lower part). In the PIR, a significant main effect of USV and behavior, and a significant USV × behavior interaction were observed. *Post hoc* comparisons showed that USV emission during escape was associated with an increase in beta mean power.

Gamma Band mean power (Fig. 4, right column)

The three-way ANOVA revealed a significant main effect of structure ($F_{(2,52)} = 3.69$, $p = 0.02$), and a significant interaction for USV × structure ($F_{(2,52)} = 4.20$, $p = 0.02$) and behavior × structure ($F_{(2,52)} = 5.29$, $p = 0.008$). The two-way ANOVA revealed a significant main effect of behavior, and a significant USV × behavior interaction in the three recording sites (Extended Data Fig. 4-2). *Post hoc* comparisons showed that gamma mean power was lower during silent freezing than during silent escape. In addition, USV emission during escape temporally coincided with an increase in gamma mean power. Noteworthy, USV emission during both freezing and escape was associated with a narrowing of the activity toward the lower range of the band and an increase in gamma peak power (as can be seen on the power spectra of Fig. 4, left column).

In summary, during silent freezing, gamma band mean power is lower than during silent escape. In addition, the emission of USV coincides with an increase in gamma band activity (mainly during escape) added to a narrowing of the activity toward the lower range of the band where the peak power is increased. Finally, in the PIR and mPFC (but not in BLA), the emission of USV during escape is associated with an increase in beta activity power.

USV emission strongly affects instantaneous respiratory rate

As previously reported in the literature, we found that the emission of USV drastically changes the shape and frequency of the respiratory signal (see individual examples in Fig. 5*A*). Figure 5*B* illustrates the probability distribution function (PDF) of respiration in our four experimental categories. A three-way ANOVA revealed a highly significant behavior × USV × respiratory frequency interaction ($F_{(32,1344)} = 5.44$, $p < 0.000001$) and further two-way ANOVAs showed a significant main effect of USV for both freezing ($F_{(1,21)} = 6.29$, $p = 0.02$) and escape ($F_{(1,21)} = 18.05$, $p = 0.0004$) states. The emission of USV shifts the dominant respiratory frequency toward lower values, going from 6.3 to 1.4 Hz for escape and from 2.8 to 1 Hz for freezing (Fig. 5*B*, inset). The next step of our study was then to assess to what extent the frequency of oscillatory activity in the delta and theta range followed respiratory frequency, and consequently whether USV emission has an impact on this relationship.

Covariation between delta and theta oscillatory frequencies and respiratory frequency

Figure 6, upper part, highlights the fact that the respiratory frequency range delimits the range of LFP oscillatory frequency for which co-variation between the two signals frequency could be assessed.

In each experimental category, we conducted covariation matrices (Fig. 6, lower part) depicting pairwise similarities between respiratory frequency and oscillatory frequency in the delta and theta bands. During silent escape and USV escape, theta activity is preferentially expressed and shows no obvious coupling with respiration: whatever the respiratory frequency, theta activity is mostly observed with a fixed frequency around 6–7 Hz. During silent freezing, both theta and delta activities are expressed. While a clear-cut covariation is observed between delta frequency and respiratory frequency, no co-

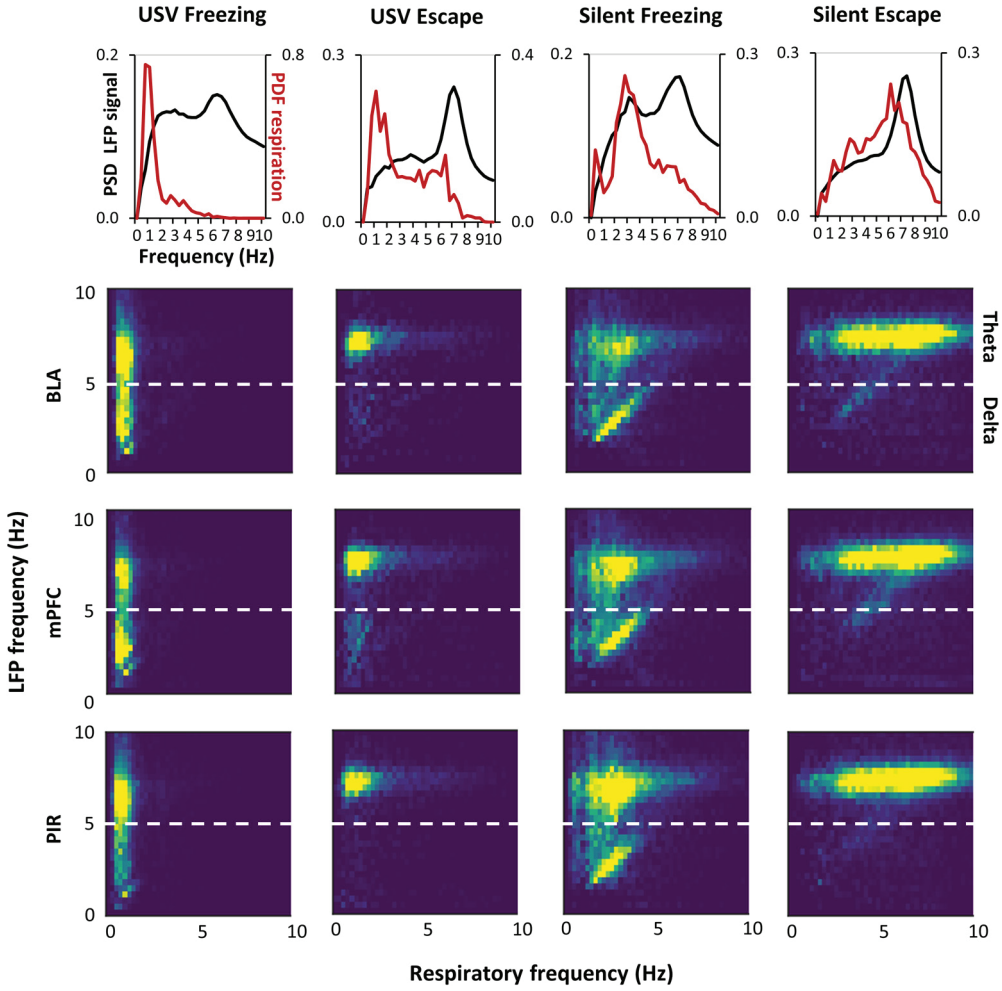


Figure 6. Covariation between delta and theta oscillatory frequencies and respiratory frequency. ***A***, Each graph represents the PSD of LFP signals (left *y*-axis, black curve) and the PDF of respiration (right *y*-axis, red curve). The graphs were obtained from LFP signals recorded in the mPFC in the four experimental categories (silent escape, USV escape, silent freezing, and USV freezing). ***B***, 2D matrix histograms obtained from LFP signals recorded in mPFC ($n = 21$), BLA ($n = 14$), and PIR ($n = 20$), *y*-axis represents LFP frequency and *x*-axis respiratory frequency. The 2D histogram is normalized so that the total sum is 1, and point density is represented on a color scale ranging from blue to yellow as the point density increases.

variation is seen for theta frequency. During USV freezing, both theta and delta activities are expressed with no coupling with respiratory frequency. Raw signal traces recorded in the same animal in the four experimental categories are reported on Extended Data Figure 6-1.

In summary, the only experimental category leading to a clear-cut frequency-frequency coupling between respiration and LFP signal is silent freezing and concerns the δ band. During USV emission, no covariation is observed between respiratory rate and delta or theta oscillatory activities.

Modulation of beta and gamma power with the phase of the respiratory cycle

It was shown that respiration can modulate not only slow neuronal oscillations, but also beta and gamma band oscillations, which amplitude is modulated in phase with respiration (Cenier et al., 2009; Ito et al., 2014). We therefore investigated whether activity in the beta and gamma bands was modulated by the phase of the respiratory cycle in our different experimental categories, and whether USV emission has an impact on this modulation. Figure 7*A* illustrates an individual example of LFP signal collected in the PIR, with the corresponding respiratory signal and USV calls. A time frequency analysis conducted on the LFP signal at the level of the respiratory cycle, clearly shows that respiration modulates beta and gamma activity power, with higher beta activity power at the beginning of expiration and higher gamma activity throughout expiration. This modulation is further evidenced by the analysis illustrated in Figure 7*B*, which represents the respiration phase-frequency map of LFP signal in the four experimental categories. We conducted this analysis in the three recording sites (Extended Data Fig. 7-1). The data illustrated in Figure 8 represent the time course of beta activity maximal power throughout the respiratory cycle. A three-way (behavior, respiratory cycle time, USV) ANOVA first revealed a significant main effect of behavior in mPFC ($F_{(1,40)} = 6.38$, $p = 0.02$) and PIR ($F_{(1,38)} = 7.93$, $p = 0.008$), and a significant respiratory

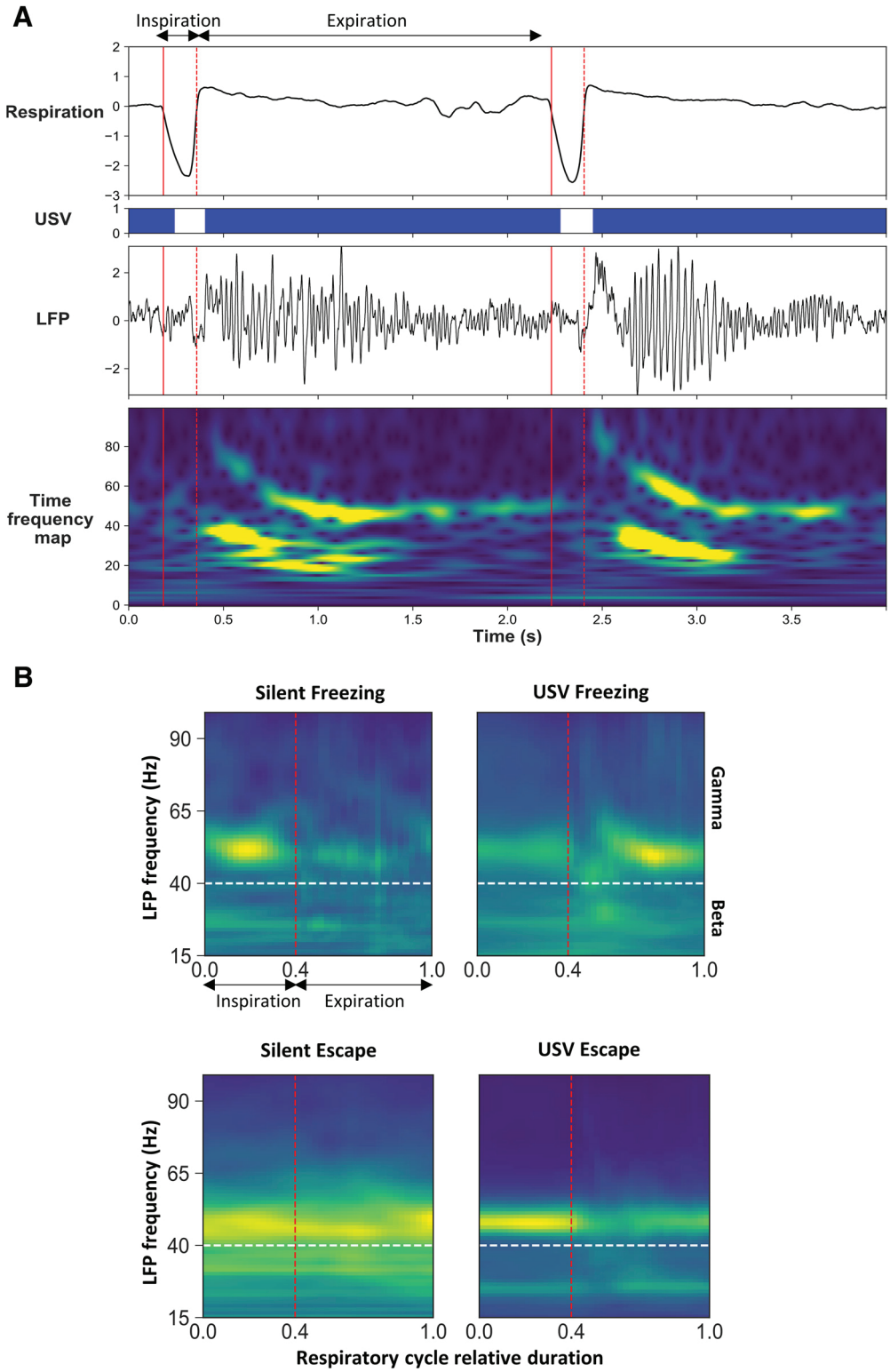


Figure 7. Modulation of beta and gamma power by the phase of the respiratory cycle. ***A***, Individual traces representing from the top, respiratory signal, USV calls, raw LFP signal recorded in the PIR and its time frequency map (*y*-axis: LFP signal frequency in Hz, *x*-axis: time in milliseconds). LFP signal power is represented using a color scale going from blue to red as the power increases. The red vertical plain line represents the transition between expiration and inspiration, while the red vertical dotted line represents the transition between inspiration and expiration. ***B***, Average time frequency map centered on the normalized respiratory cycle, in the four experimental categories. The red vertical dotted line represents the transition between inspiration and expiration phase that was set at 0.4 (this value corresponds to the mean ratio between inspiration and expiration over the four experimental categories). The white horizontal dotted line represents the transition between beta and gamma bands.

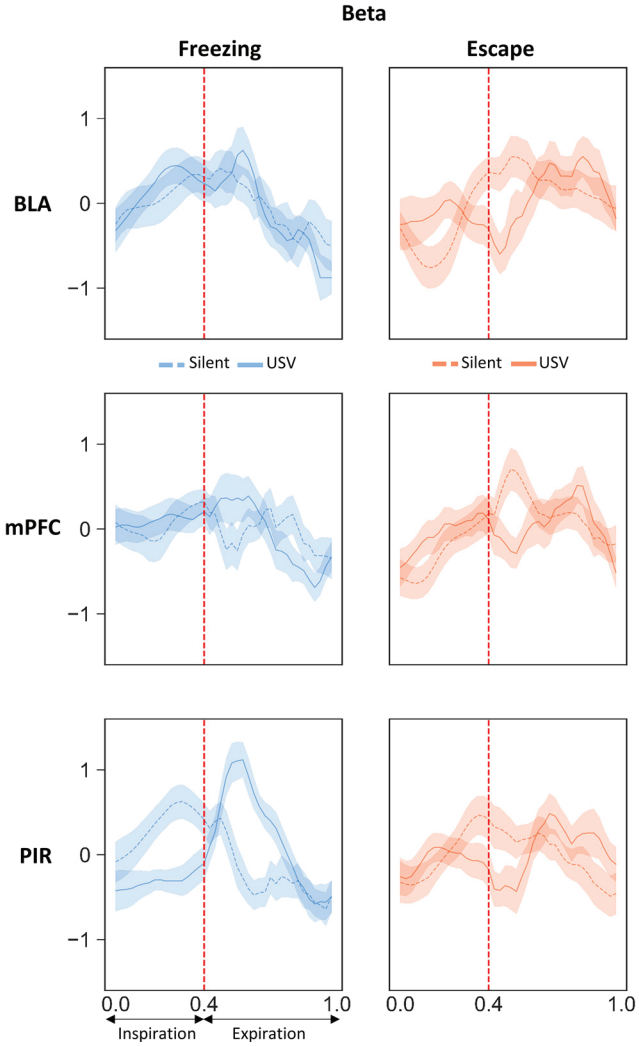


Figure 8. Beta Activity power time course throughout the normalized respiratory cycle in the three recording sites and in the four experimental categories. Left side, Silent freezing versus USV freezing. Right side, Silent escape versus USV escape. The vertical dotted line on each graph represents the transition between inspiration and expiration phase positioned at 0.4 (this value corresponds to the mean ratio between inspiration and expiration over the four experimental categories). BLA: $n = 14$; mPFC: $n = 21$; and PIR: $n = 20$.

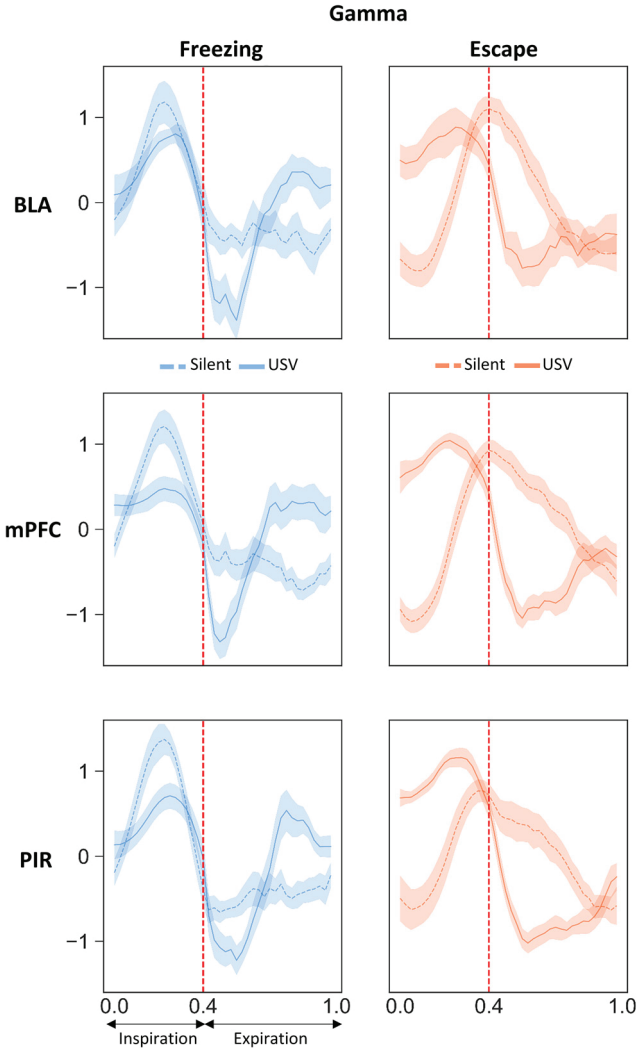


Figure 9. Gamma Activity power time course throughout the normalized respiratory cycle in the three recording sites and in the four experimental categories. Left side: Silent freezing versus USV freezing. Right side, Silent escape versus USV escape. The vertical dotted line on each graph represents the transition between inspiration and expiration phase positioned at 0.4 (this value corresponds to the mean ratio between inspiration and expiration over the four experimental categories). BLA: $n = 14$; mPFC: $n = 21$; and PIR: $n = 20$.

cycle time × behavior interaction in BLA ($F_{(39,1014)} = 2.47$, $p = 2 \times 10^{-6}$). We then analyzed the data separately for freezing and escape to compare the time course of LFP oscillatory activity power throughout the respiratory cycle, either with or without USV. During freezing (Fig. 8, left part), a two-way ANOVA revealed a significant effect of respiratory cycle time in the three recording sites and a significant interaction for USV × respiratory cycle time in the PIR only (Extended Data Fig. 8-1, upper part). In this recording site, during silent freezing, the maximum power is observed during inspiration, while during USV freezing, the maximum is shifted toward the early part of expiration. Concerning escape (Fig. 8, right part), in the three recording sites the ANOVA revealed a significant effect of respiratory cycle time but no effect of USV or USV × respiratory cycle interaction (Extended Data Fig. 8-1, upper part). The time course of gamma activity maximal power throughout the respiratory cycle is reported in Figure 9. The three-way (behavior, respiratory cycle time, USV) ANOVA revealed a significant respiratory cycle time × USV × behavior interaction in BLA ($F_{(39,1014)} = 0.58$, $p = 1 \times 10^{-7}$), mPFC ($F_{(39,1560)} = 3.75$, $p = 1 \times 10^{-7}$), and PIR ($F_{(39,1482)} = 4.18$, $p = 1 \times 10^{-7}$). We then analyzed the data separately for freezing and escape. During freezing (Fig. 9, left part), the two-way ANOVA revealed a significant effect of respiratory cycle time and a significant interaction for USV × respiratory cycle time in the three recording sites (Extended Data Fig. 8-1, lower part). During silent freezing, the maximum power is observed during inspiration, while during USV freezing, two maxima are

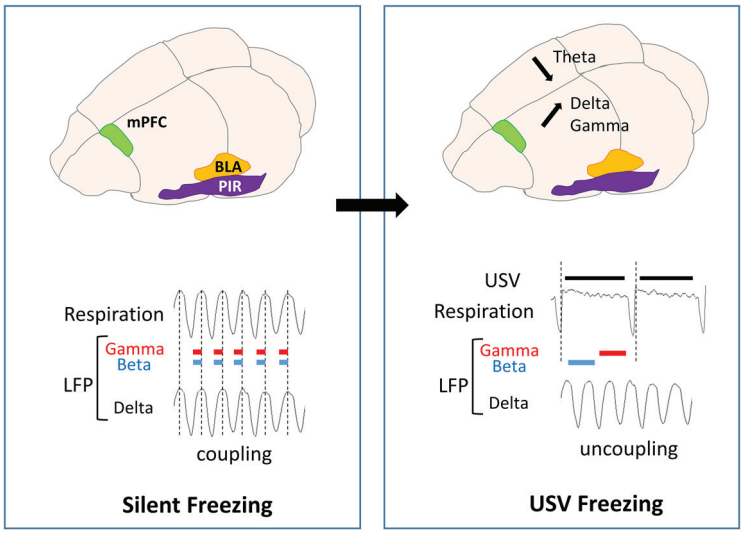


Figure 10. Schematic summary of the data obtained during silent freezing and USV freezing. During silent freezing, delta frequency covaries with nasal respiratory frequency. In addition, power in the beta band for the PIR and in the gamma band for the three recording sites is modulated in phase with respiration, with higher beta and gamma power during inspiration than expiration. USV freezing emission coincides with a decrease in theta power and an increase in delta and gamma power. In parallel, a deep slow-down of respiratory frequency is observed, with the uncoupling between delta frequency and respiratory frequency. Furthermore, a reorganization of beta and gamma activity power during the respiratory cycle occurs, with increased β power in the PIR during the first half of expiration phase, and increased gamma power in the three recording sites during the second half of expiration.

observed, one during inspiration, and the other during the late part of expiration. Concerning escape (Fig. 9, right part), the ANOVA revealed a significant effect of respiratory cycle time and USV (except for BLA), and a significant interaction for USV $\times$ respiratory cycle (Extended Data Fig. 8-1, lower part). During silent escape, the maximum power is observed at the transition between inspiration and expiration, while during USV escape, the maximum is shifted toward inspiration.

In summary, in the PIR beta power is modulated by the phase of the respiratory cycle during freezing and the pattern of this modulation is changed during USV emission. Gamma Power in the three recording sites is strongly modulated by the phase of the respiratory cycle during both freezing and escape, although presenting slightly different patterns. The emission of USV is associated with drastic changes in the time course of this modulation.

Discussion

The present study assessed for the first time the impact of 22-kHz USV production on brain dynamics in the network involved in fear expression, including the mPFC and the BLA. We report that USV emission modulates oscillatory activities differentially depending on their frequency band. Specifically, it temporally coincides with an increase in delta and gamma power, and a decrease in theta power. In addition, in the PIR, an increase in beta activity is observed. Some of these changes co-occur with USV-induced respiration changes. Indeed, during USV calls, the coupling observed between respiratory frequency and delta oscillatory frequency during silent freezing is lost, and the time course of gamma and beta power within the respiratory cycle is modified. The present data suggest that USV calls could result in a specific gating of information within the fear network, potentially modulating fear memory, as suggested by our observation that the amount of USV emitted during conditioning is a good predictor of the learned fear response at retention.

22-kHz USVs are observed during both passive and active fear responses

22-kHz USVs in rats are emitted in aversive situations such as foot-shock delivery and are considered as reflecting a negative affective state (Litvin et al., 2007; Schwarting and Wöhr, 2012; Brudzynski, 2013). We found that USVs are predominantly produced during freezing, which is consistent with the literature (Brudzynski and Ociepa, 1992; Wöhr et al., 2005; Hegoburu et al., 2011; Shionoya et al., 2013; Boulanger Bertolus et al., 2014; Boulanger-Bertolus et al., 2017). However, we also found that some USVs are emitted during escape. Although some examples of 22-kHz USV during locomotion have been reported (Laplagne and Elías Costa, 2016; Boulanger-Bertolus et al., 2017), the characteristics of these USV remain poorly investigated. Here, we show that 22-kHz USV emitted during escape are shorter and louder than those emitted during freezing and exhibit a higher peak frequency.

We also show that although these two types of USV have globally similar effects on brain oscillations, they present different relationships with performance at 48-h retention. Indeed, while there is a positive correlation between the number of USV freezing during conditioning and the amount of freezing at retention, this correlation is not found for USV escape. This suggests that the two subtypes of 22-kHz USV reflect different aspects of fear response. For instance, USV Escape might be more related to the unconditioned response to shock, while USV freezing are generally considered as

part of the conditioned fear response (Wöhr and Schwarting, 2008).

Freezing and escape differentially modulate brain oscillatory activities

We first investigated whether in the absence of USV emission, the way fear is expressed is associated with different changes in brain oscillatory activities. Freezing is a passive defense response while escape is an active response. Recent studies pinpointed that active and passive fear responses involve distinct and mutually inhibitory neurons in the central amygdala (Gozzi et al., 2010; Fadok et al., 2017). Here, we show that these two response modes also differentially modulate oscillatory activity in the fear circuit. Indeed, compared to escape, freezing is characterized by a higher delta power and a lower θ and γ power. Our data in the delta band are in line with the literature as several recent studies showed that freezing temporally coincides with the development of 4-Hz oscillations in prefrontal-amygdala circuits (Dejean et al., 2016; Karalis et al., 2016; Moberly et al., 2018). In awake animals, θ activity is known to occur preferentially during voluntary locomotor activities (Vanderwolf, 1969; Buzsáki, 2002), thus explaining the increase in theta power observed here during escape. Finally, the increase in gamma power observed during escape might reflect an increased emotional level compared to freezing. Indeed, previous studies both in humans and animals have shown that gamma oscillations are enhanced during emotional situations (for review, see Headley and Paré, 2013; Stujenske et al., 2014; Concina et al., 2018).

22-kHz USV emission alters respiration and is associated with changes in oscillatory activities

While several studies have investigated the neural circuit involved in USV production (for review, see Schwarting and Wöhr, 2012), and the correlates of USV perception in the brain of conspecifics receivers (Sadananda et al., 2008; Parsana et al., 2012; Roberts and Portfors, 2015), to our knowledge no study has assessed the effect of USV production on the sender animal's brain oscillatory activities. We showed that USV emission coincides with an increase in delta power and a decrease in θ power. In addition, an increase in gamma power is observed. The effects are globally similar for both types of USV, and in the three recording sites although small differences exist. Furthermore, a strong increase in beta power is more specifically observed in the PIR.

Importantly, some of the changes observed during USV emission co-occurred with changes in respiratory rhythm. USVs are produced during expiration on constriction of the vocal folds resulting in an increase in subglottal pressure and a reduction of airflow through the nose (Riede, 2011; Sirotin et al., 2014). Consequently, 22-kHz USV emission induces drastic changes in the shape and frequency of the respiratory signal (Frysztak and Neafsey, 1991; Hegoburu et al., 2011; Boulanger-Bertolus et al., 2017). It is known from a long time that respiration drives oscillations time-locked to breathing cycles in the olfactory pathways (Adrian, 1942; Fontanini and Bower, 2005; Buonviso et al., 2006; Kay et al., 2009; Courtiol et al., 2011; Esclassan et al., 2012; Zelano et al., 2016) and modulates the amplitude of local beta and gamma oscillations in the olfactory bulb (Buonviso et al., 2003; Cenier et al., 2009; Rosero and Aylwin, 2011) and in the olfactory cortex (Fontanini and Bower, 2005; Zelano et al., 2016). Several recent papers have highlighted that outside its impact on olfactory regions, nasal respiration also entrains oscillations in widespread brain regions in awake rodents (Ito et al., 2014; Nguyen Chi et al., 2016; Biskamp et al., 2017; Zhong et al., 2017; Rojas-Líbano et al., 2018; Tort et al., 2018b) and modulates the amplitude of fast oscillations (Ito et al., 2014; Biskamp et al., 2017; Zhong et al., 2017). Importantly a recent work has specifically investigated the link between respiration and freezing-related 4-Hz oscillation in the mPFC (Moberly et al., 2018), and reported that during freezing, mice respiratory frequency is correlated with the 4-Hz oscillation in the mPFC, and that disruption of olfactory inputs to the mPFC significantly reduces the 4-Hz oscillation.

Here, we show that during silent freezing, dominant frequency in the delta band covaries with respiratory frequency. In addition, we report that the activity in the gamma band for the three recording sites, and in the beta band for PIR, are modulated in phase with respiration, with greater beta and gamma power during inspiration than expiration (see summary in Fig. 10). Importantly we also show that USV emission, particularly during freezing, coincides with important changes in the relationship between respiration and oscillatory activity. First, USV emission induces a deep slow-down of respiratory frequency. In parallel, the coupling between δ band dominant frequency and respiratory frequency is lost. In addition, a reorganization of beta and gamma activity power during the respiratory cycle occurs, with increased beta power in PIR during the first half of expiration phase, and increased gamma power in the three recording sites during the second half of expiration.

Functional interpretation

How can we integrate the present data to the existing literature? Respiration-locked oscillations in non-olfactory regions were shown to depend on nasal airflow (Ito et al., 2014; Yanovsky et al., 2014). Indeed, olfactory sensory neurons have mechanosensitive properties (Grosmaitre et al., 2007) and the signals elicited by rhythmic airflow in the nose are transmitted to the olfactory bulb and the PIR (Fontanini et al., 2003; Wu et al., 2017). The PIR has direct connections with the PFC (Clugnet and Price, 1987) and the olfactory information has unique direct access to the amygdala (McDonald, 1998). We propose that the deep slow-down of respiratory rate added to the reduction of airflow through the nose during USV calls (Riede, 2011; Sirotin et al., 2014) is responsible for the loss of coupling between nasal rhythm and δ oscillation. During USV calls, brain delta oscillations become independent of nasal respiration and their power increases. In parallel, beta and gamma activity power increases during expiration. Interestingly, Manabe and Mori (2013) reported that in olfactory regions, gamma oscillations can lock to different phases of the respiratory cycle depending on the animal's

behavior. Indeed, during active exploration with high sniffing rate, gamma is phase-locked to inhalation, while during awake resting in which rats show a slow respiration rate with long exhalation phase, gamma is phase-locked to exhalation. The authors propose that gamma oscillatory coupling can be generated either by olfactory sensory inputs during inhalation, or centrally in the brain during exhalation. The same kind of interpretation could hold for our data, with the emission of USV being associated with a reorganization of gamma coupling during expiration, potentially resulting in a different gating of information to downstream structures of the fear network. Since we observed that the amount of USV emitted during freezing at training is correlated with the learned freezing response at retention, we suggest that the window of a USV call and its particular respiratory pattern added to its specific combination of brain oscillatory activity, might enhance plasticity at given sites of the network and ultimately strengthen long-term fear memory. Additional experiments are needed to explore the causal link between USV-related changes in oscillatory activities and fear memory.

A better knowledge of the impact of USV production on brain neural dynamics is not only important for understanding the respective weight of the different components of fear response, but is also particularly relevant for rodent models of human neuropsychiatric disorders, for which socio-affective communication is severely impaired (Wöhr and Scattoni, 2013).

References

Adrian ED (1942) Olfactory reactions in the brain of the hedgehog. J Physiol 100:459–473.

Biskamp J, Bartos M, Sauer JF (2017) Organization of prefrontal network activity by respiration-related oscillations. Scientific reports 7:45508.

Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Crouching as an index of fear. J Comp Physiol Psychol 67:370–375.

Bocchio M, Nabavi S, Capogna M (2017) Synaptic plasticity, engrams, and network oscillations in amygdala circuits for storage and retrieval of emotional memories. Neuron 94:731–743.

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

Boulanger-Bertolus J, Rincón-Cortés M, Sullivan RM, Mouly AM (2017) Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. Sci Rep 7:13483.

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

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

Buonviso N, Amat C, Litaudon P, Roux S, Royet JP, Farget V, Sicard G (2003) Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. Eur J Neurosci 17: 1811–1819.

Buonviso N, Amat C, Litaudon P (2006) Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. Chem Senses 31:145–154.

Buzsáki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. Neuron 33:325–340.

Cenier T, David F, Litaudon P, Garcia S, Amat C, Buonviso N (2009) Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb. Eur J Neurosci 29:921–930.

Clugnet MC, Price JL (1987) Olfactory input to the prefrontal cortex in the rat. Ann NY Acad Sci 510:231–235.

Concina G, Cambiaghi M, Renna A, Sacchetti B (2018) Coherent activity between the prelimbic and auditory cortex in the slow-gamma band underlies fear discrimination. J Neurosci 38:8313–8328.

Corcoran KA, Quirk GJ (2007) Activity in prelimbic cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. J Neurosci 27:840–844.

Courtiol E, Hegoburu C, Litaudon P, Garcia S, Fourcaud-Trocmé N, Buonviso N (2011) Individual and synergistic effects of sniffing frequency and flow rate on olfactory bulb activity. J Neurophysiol 106:2813–2824.

Dejean C, Courtin J, Karalis N, Chaudun F, Wurtz H, Bienvenu TC, Herry C (2016) Prefrontal neuronal assemblies temporally control fear behaviour. Nature 535:420–424.

Esclassan F, Courtiol E, Thévenet M, Garcia S, Buonviso N, Litaudon P (2012) Faster, deeper, better: the impact of sniffing modulation on bulbar olfactory processing. PLoS One 7:e40927.

Fadok JP, Krabbe S, Markovic M, Courtin J, Xu C, Massi L, Botta P, Bylund K, Müller C, Kovacevic A, Tovote P, Lüthi A (2017) A competitive inhibitory circuit for selection of active and passive fear responses. Nature 542:96–100.

Fontanini A, Bower JM (2005) Variable coupling between olfactory system activity and respiration in ketamine/xylazine anesthetized rats. J Neurophysiol 93:3573–3581.

Fontanini A, Spano P, Bower JM (2003) Ketamine-xylazine-induced slow ($<$ 1.5 Hz) oscillations in the rat piriform (olfactory) cortex are functionally correlated with respiration. J Neurosci 23:7993–8001.

Frysztak RJ, Neafsey EJ (1991) The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, "freezing," and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. Cereb Cortex 1:418–425.

Gozzi A, Jain A, Giovannelli A, Bertollini C, Crestan V, Schwarz AJ, Tsetsenis T, Ragozzino D, Gross CT, Bifone A (2010) A neural switch for active and passive fear. Neuron 67:656–666.

Grosmaitre X, Santarelli LC, Tan J, Luo M, Ma M (2007) Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. Nat Neurosci 10:348–354.

Headley DB, Paré D (2013) In sync: gamma oscillations and emotional memory. Front Behav Neurosci 7:170.

Heck DH, McAfee SS, Liu Y, Babajani-Feremi A, Rezaie R, Freeman WJ, Wheless JW, Papanicolaou AC, Ruszinkó M, Sokolov Y, Kozma R (2017) Breathing as a fundamental rhythm of brain function. Front Neural Circuits 10:115.

Haberly LB (1973) Summed potentials evoked in opossum prepyriform cortex. J Neurophysiol 36:775–788.

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

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

Hegoburu C, Parrot S, Ferreira G, Mouly AM (2014) Differential involvement of amygdala and cortical NMDA receptors activation upon encoding in odor fear memory. Learn Mem 21:651–655.

Herry C, Johansen JP (2014) Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. Nat Neurosci 17:1644–1654.

Ito J, Roy S, Liu Y, Cao Y, Fletcher M, Lu L, Boughter JD, Grün S, Heck DH (2014) Whisker barrel cortex delta oscillations and gamma power in the awake mouse are linked to respiration. Nat Commun 5:3572.

Jensen O, Colgin LL (2007) Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. Trends Cogn Sci 11:267–269.

Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J, Herry C (2016) 4-Hz

oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. Nat Neurosci 19:605–612.
Kay LM, Beshel J, Brea J, Martin C, Rojas-Líbano D, Kopell N (2009) Olfactory oscillations: the what, how and what for. Trends Neurosci 32:207–214.
Kronland-Martinet R, Morlet J, Grossmann A (1987) Analysis of sound patterns through wavelet transforms. Int J Pattern Recog Art Intel 1:273–302.
Laplagne DA, Elías Costa M (2016) Rats synchronize locomotion with ultrasonic vocalizations at the subsecond time scale. Front Behav Neurosci 10:184.
LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 23:155–184.
Likhtik E, Stujenske JM, Topiwala MA, Harris AZ, Gordon JA (2014) Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. Nat Neurosci 17:106–113.
Litvin Y, Blanchard DC, Blanchard RJ (2007) Rat 22kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. Behav Brain Res 182:166–172.
Manabe H, Mori K (2013) Sniff rhythm-paced fast and slow gamma-oscillations in the olfactory bulb: relation to tufted and mitral cells and behavioral states. Journal of neurophysiology 110:1593–1599.
McDonald AJ (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. Prog Neurobiol 55:257–332.
Moberly AH, Schreck M, Bhattarai JP, Zweifel LS, Luo W, Ma M (2018) Olfactory inputs modulate respiration-related rhythmic activity in the prefrontal cortex and freezing behavior. Nat Commun 9:1528.
Nguyen Chi V, Müller C, Wolfenstetter T, Yanovsky Y, Draguhn A, Tort AB, Brankačk J (2016) Hippocampal respiration-driven rhythm distinct from theta oscillations in awake mice. J Neurosci 36:162–177.
Parsana AJ, Li N, Brown TH (2012) Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. Behav Brain Res 226:77–86.
Paxinos G, Watson C (2007) The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: Academic Press. [CrossRef]
Popa D, Duvarci S, Popescu AT, Léna C, Paré D (2010) Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. Proc Natl Acad Sci USA 107:6516–6519.
Riede T (2011) Subglottal pressure, tracheal airflow, and intrinsic laryngeal muscle activity during rat ultrasound vocalization. J Neurophysiol 106:2580–2592.
Roberts PD, Portfors CV (2015) Responses to social vocalizations in the dorsal cochlear nucleus of mice. Front Syst Neurosci 9:172.
Rojas-Líbano D, Wimmer Del Solar J, Aguilar-Rivera M, Montefusco-Siegmund R, Maldonado PE (2018) Local cortical activity of distant brain areas can phase-lock to the olfactory bulb's respiratory rhythm in the freely behaving rat. J Neurophysiol 120:960–972.
Rosero MA, Aylwin ML (2011) Sniffing shapes the dynamics of olfactory bulb gamma oscillations in awake behaving rats. Eur J Neurosci 34:787–799.
Roux SG, Cenier T, Garcia S, Litaudon P, Buonviso N (2007) A wavelet-based method for local phase extraction from a multi-frequency oscillatory signal. J Neurosci Methods 160:135–143.
Sacco T, Sacchetti B (2010) Role of secondary sensory cortices in emotional memory storage and retrieval in rats. Science 329:649–656.
Sadananda M, Wöhr M, Schwarting RK (2008) Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. Neurosci Lett 435:17–23.
Schwarting RK, Wöhr M (2012) On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. Braz J Med Biol Res 45:337–348.
Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. Science 301:846–850.
Sevelinges Y, Gervais R, Messaoudi B, Granjon L, Mouly AM (2004) Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. Learn Mem 11:761–769.
Shionoya K, Hegoburu C, Brown BL, Sullivan RM, Doyère V, Mouly AM (2013) It's time to fear! Interval timing in odor fear conditioning in rats. Front Behav Neurosci 7:128.
Sirotin YB, Costa ME, Laplagne DA (2014) Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior. Front Behav Neurosci 8:399.
Stujenske JM, Likhtik E, Topiwala MA, Gordon JA (2014) Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala. Neuron 83:919–933.
Tort ABL, Brankačk J, Draguhn A (2018a) Respiration-entrained brain rhythms are global but often overlooked. Trends Neurosci 41:186–197.
Tort ABL, Ponsel S, Jessberger J, Yanovsky Y, Brankačk J, Draguhn A (2018b) Parallel detection of theta and respiration-coupled oscillations throughout the mouse brain. Sci Rep 8:6432.
Vanderwolf CH (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 26: 407–418.
Wöhr M, Schwarting RK (2008) Maternal care, isolation-induced infant ultrasonic calling, and their relations to adult anxiety-related behavior in the rat. Behav Neurosci 122:310–330.
Wöhr M, Scattoni ML (2013) Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: current standards and new developments. Behav Brain Res 251:5–17.
Wöhr M, Borta A, Schwarting RK (2005) Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. Neurobiol Learn Mem 84:228–240.
Wu R, Liu Y, Wang L, Li B, Xu F (2017) Activity patterns elicited by airflow in the olfactory bulb and their possible functions. J Neurosci 37:10700–10711.
Yanovsky Y, Ciatipis M, Draguhn A, Tort AB, Brankačk J (2014) Slow oscillations in the mouse hippocampus entrained by nasal respiration. J Neurosci 34:5949–5964.
Zelano C, Jiang H, Zhou G, Arora N, Schuele S, Rosenow J, Gottfried JA (2016) Nasal respiration entrains human limbic oscillations and modulates cognitive function. J Neurosci 36:12448–12467.
Zhong W, Ciatipis M, Wolfenstetter T, Jessberger J, Müller C, Ponsel S, Yanovsky Y, Brankačk J, Tort ABL, Draguhn A (2017) Selective entrainment of gamma subbands by different slow network oscillations. Proc Natl Acad Sci USA 114:4519–4524.

EXTENDED DATA FIGURES

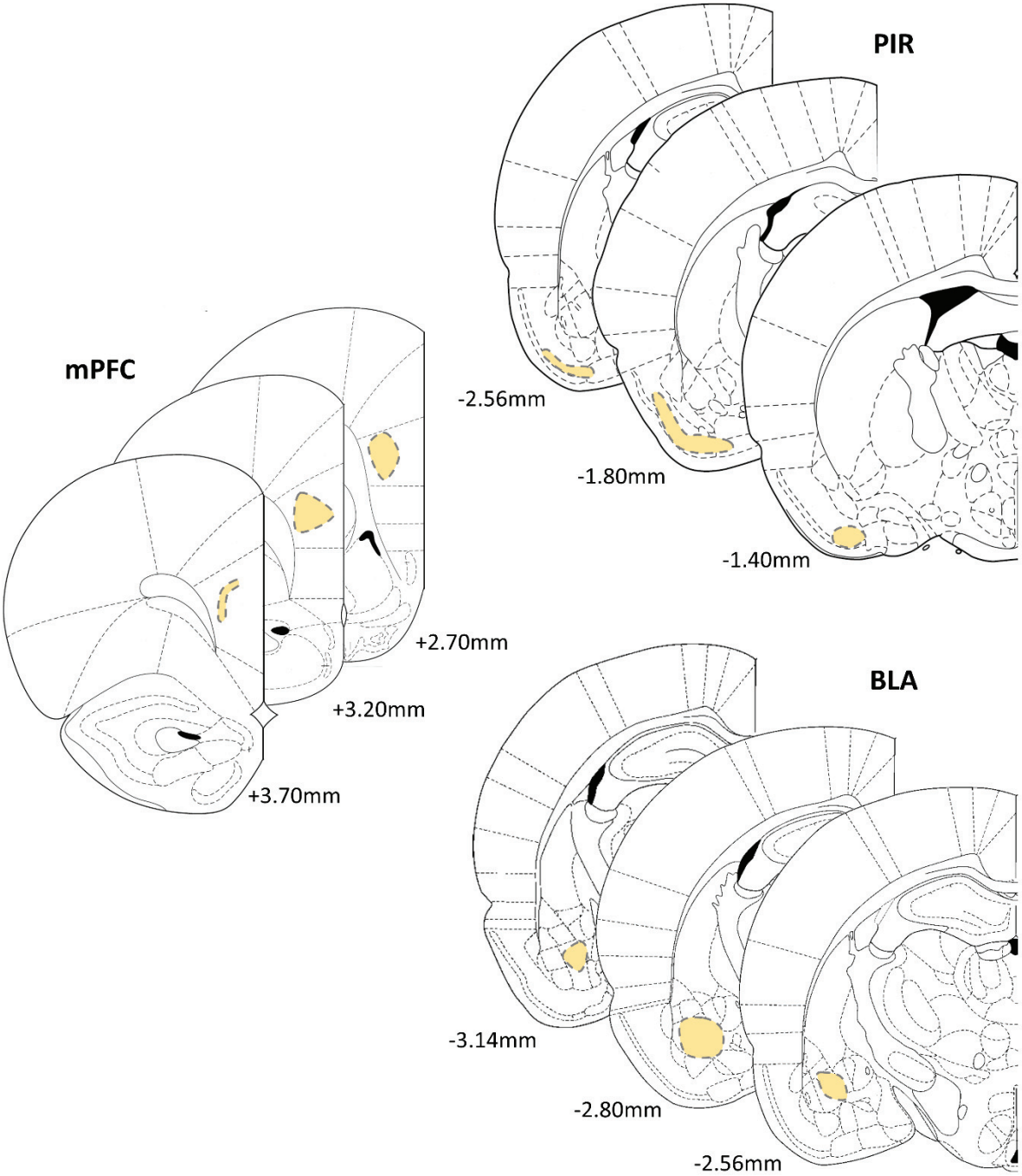


Figure 1-1

Figure 1-1: *Areas targeted by the electrodes (light orange areas) in the three recording sites. Numbers at the bottom indicate the relative position of coronal slices from bregma (adapted from Paxinos and Watson, 2007). mPFC: n = 21; PIR: n = 20; and BLA: n = 14*

Oscillatory Band	Structure	Factor	F (ddl)	F value	P value
Delta Mean power	BLA	USV	1,13	17.97	$1x10^{-3}$**
		Behavior		11.26	$5x10^{-3}$**
		USVxBehavior		0.62	0.4
	mPFC	USV	1,20	17.56	$5x10^{-4}$***
		Behavior		5.70	$3x10^{-2}$*
		USVxBehavior		9.28	$6x10^{-3}$*
	PIR	USV	1,19	13.25	$2x10^{-3}$**
		Behavior		33.22	$1x10^{-5}$***
		USVxBehavior		0.15	0.7
Theta Mean power	BLA	USV	1,13	18.82	$8x10^{-4}$**
		Behavior		28.43	$1x10^{-4}$***
		USVxBehavior		0.01	0.9
	mPFC	USV	1,20	27.77	$4x10^{-5}$***
		Behavior		114.73	$1x10^{-5}$***
		USVxBehavior		2.13	0.2
	PIR	USV	1,19	0.01	0.9
		Behavior		61.99	$1x10^{-5}$***
		USVxBehavior		0.70	0.4

Oscillatory Band	Structure	Silent Freezing vs Silent Escape	USV Freezing vs USV Escape	Silent Freezing vs USV Freezing	Silent Escape vs USV Escape
Delta Mean power	BLA	$3x10^{-2}$*	0.1	$5x10^{-3}$*	$6x10^{-3}$*
	mPFC	$1x10^{-3}$***	0.7	0.1	$7x10^{-5}$***
	PIR	$8x10^{-4}$**	$1x10^{-3}$*	$3x10^{-2}$*	$1x10^{-4}$***
Theta Mean power	BLA	$7x10^{-6}$***	$8x10^{-4}$*	$2x10^{-2}$*	$1x10^{-4}$***
	mPFC	$1x10^{-6}$***	$1x10^{-6}$***	$6x10^{-3}$*	$1x10^{-4}$***
	PIR	$1x10^{-6}$***	$1x10^{-3}$**	0.7	0.5

Figure 3-1

Figure 3-1*: Delta and Theta activity mean power statistical data: ANOVA analysis (upper table) and p values for post-hoc comparisons (lower table). * : $p \leq 5x10^{-2}$, ** : $p \leq 5x10^{-3}$, *** : $p \leq 5x10^{-4}$.*

	Silent Escape	USV Escape	Silent Freezing	USV Freezing
BLA	0.062±0.005	0.064±0.005	0.062±0.005	0.063±0.004
mPFC	0.062±0.003	0.064±0.003	0.063±0.003	0.064±0.003
PIR	0.087±0.010	0.099±0.007	0.077±0.007	0.079±0.013

Structure	Factor	F (ddl)	F value	p value
BLA	USV	1,13	2.24	0.2
	Behavior		0.11	0.7
	USVxBehavior		0.40	0.5
mPFC	USV	1,20	11.60	$3x10^{-3}$**
	Behavior		0.53	0.5
	USVxBehavior		2.43	0.1
PIR	USV	1,19	9.04	$7x10^{-3}$*
	Behavior		6.06	$2x10^{-2}$*
	USVxBehavior		9.58	$6x10^{-3}$*

Structure	Silent Freezing vs Silent Escape	USV Freezing vs USV Escape	Silent Freezing vs USV Freezing	Silent Escape vs USV Escape
BLA	0.9	0.6	0.2	0.3
mPFC	0.1	0.9	$1x10^{-2}$*	$1x10^{-2}$*
PIR	0.1	$1x10^{-2}$*	0.5	$2x10^{-3}$**

Figure 4-1

Figure 4-1*: Beta band mean power values (+/- sem) in the three recording sites (upper table), ANOVA analysis (middle table), and p values for post-hoc comparisons (lower table). * : $p \leq 5x10^{-2}$, ** : $p \leq 5x10^{-3}$, *** : $p \leq 5x10^{-4}$.*

Structure	Factor	F (ddl)	F value	p value
BLA	USV	1,13	1.53	0.2
	Behavior		78.54	$1x10^{-5}$***
	USVxBehavior		6.99	$2x10^{-2}$*
mPFC	USV	1,20	0.80	0.4
	Behavior		59.79	$1x10^{-5}$***
	USVxBehavior		15.69	$8x10^{-4}$**
PIR	USV	1,19	6.29	$2x10^{-2}$*
	Behavior		31.94	$2x10^{-5}$***
	USVxBehavior		11.74	$3x10^{-2}$*

Structure	Silent Freezing vs Silent Escape	USV Freezing vs USV Escape	USV Freezing vs Silent Freezing	USV Escape vs Silent Escape
BLA	$1x10^{-6}$***	$2x10^{-5}$***	0.1	$2x10^{-2}$*
mPFC	$5x10^{-6}$***	$1x10^{-6}$***	$3x10^{-2}$*	$9x10^{-3}$*
PIR	$6x10^{-4}$**	$4x10^{-6}$***	0.4	$9x10^{-4}$**

Figure 4-2

Figure 4-2: *Gamma band mean power statistical data in the three recording sites: ANOVA analysis (upper table) and p values for post-hoc comparisons (lower table). * : $p \leq 5x10^{-2}$, ** : $p \leq 5x10^{-3}$, *** : $p \leq 5x10^{-4}$.*

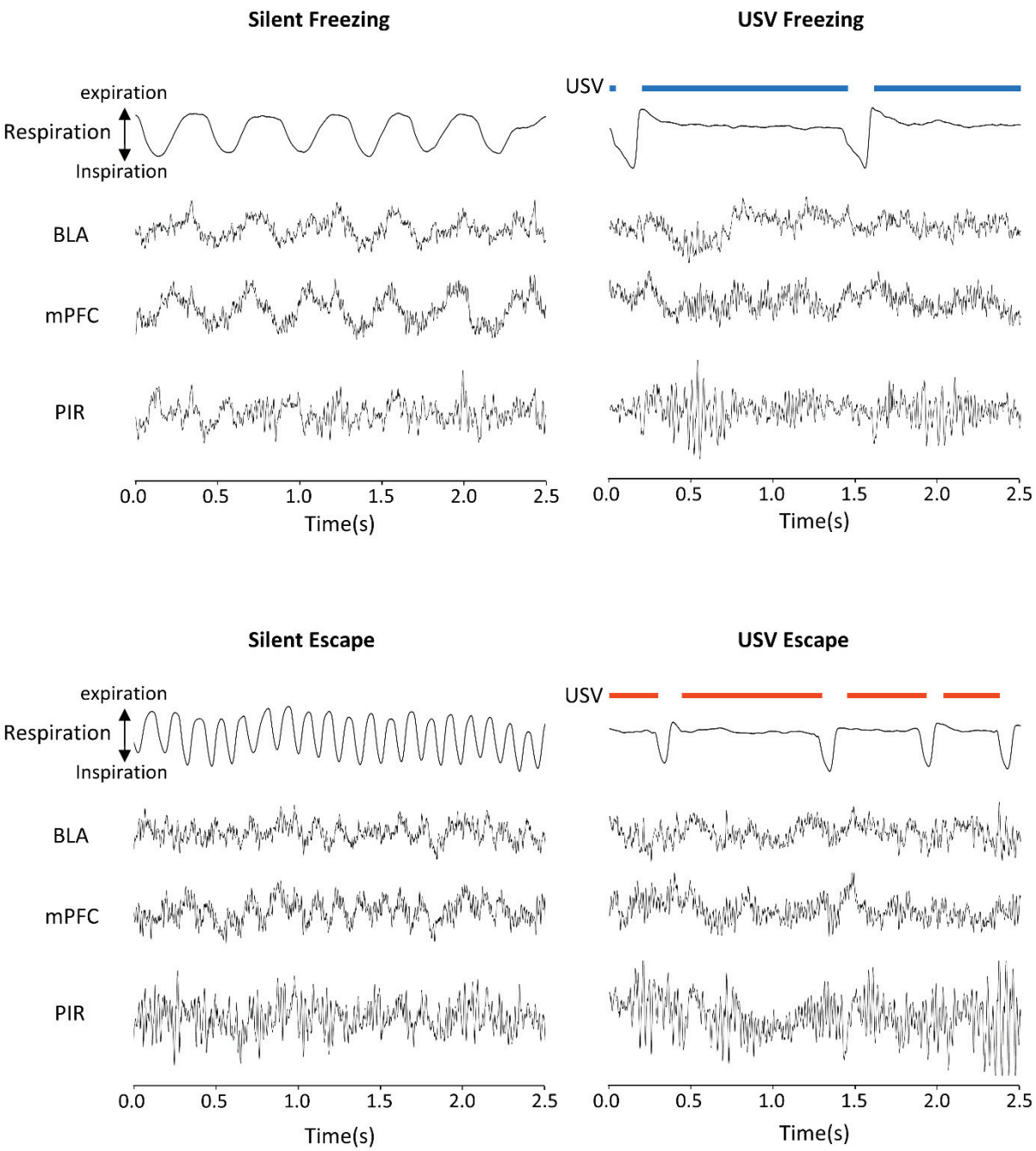


Figure 6-1

Figure 6-1: *Examples of raw traces obtained in the same animal in the three recording sites and the four experimental categories. Each panel represents from the top: USVs calls (for the panels on the right), raw respiratory signal, and LFP signals recorded in the BLA, mPFC, and PIR.*

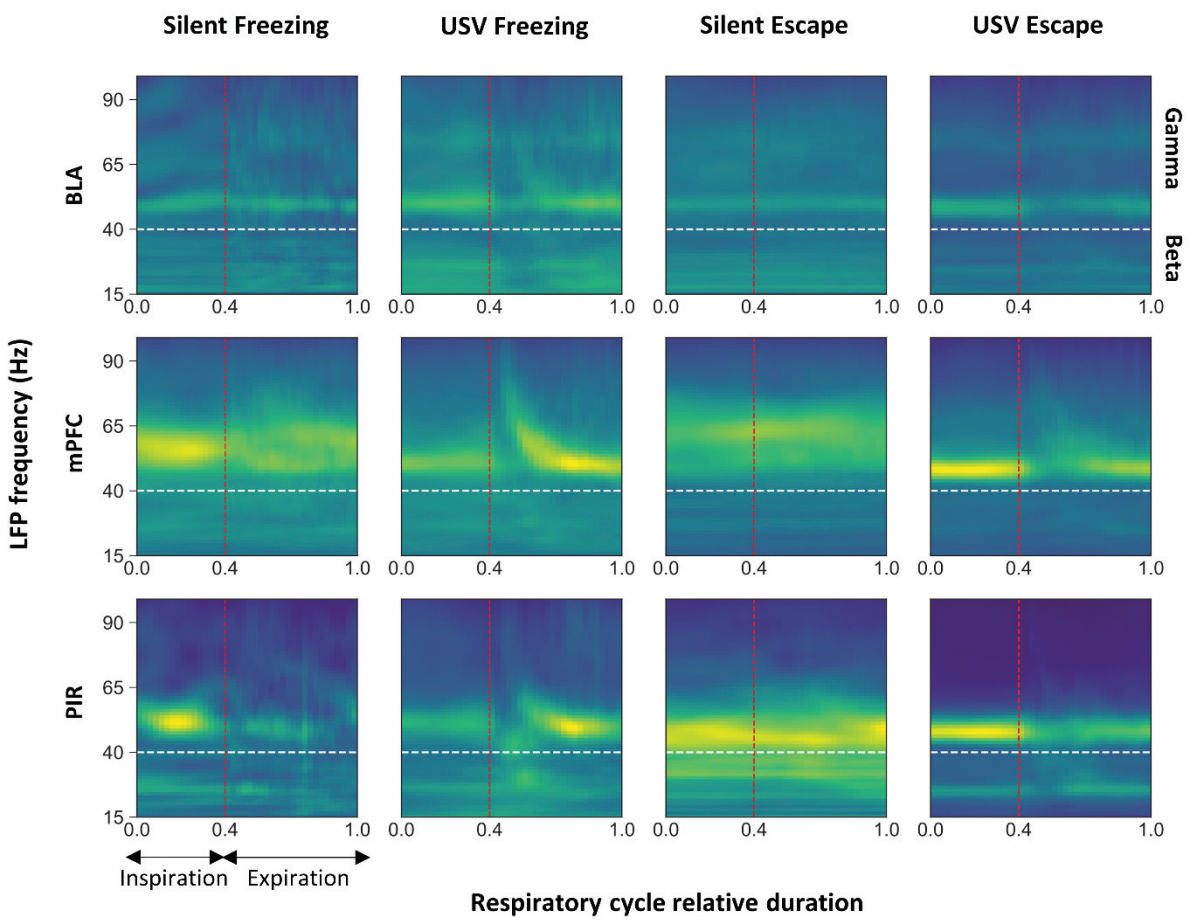


Figure 7-1

Figure 7-1: *Modulation of β and γ power by the phase of the respiratory cycle. Average time frequency maps centered on the normalized respiratory cycle, in the three-recorded structures (along the vertical axis) and the four experimental categories (along the horizontal axis). On each graph, the red vertical dotted line represents the transition between inspiration and expiration that was set at 0.4, and the white horizontal dotted line represents the transition between β and γ bands. BLA:* n *= 14; mPFC:* n *= 21; and PIR:* n *= 20.*

Beta band		Freezing			Escape		
Structure	**Factor**	**F (ddl)**	**F value**	**p value**	**F (ddl)**	**F value**	**p value**
BLA	**Respiratory cycle time**	39,507	2.32	$2x10^{-5}$***	39,507	2.35	$1x10^{-5}$***
	USV	1,13	2.4	0.1	1,13	0.11	0.7
	Respiratory cycle time x USV	39,507	1.05	0.4	39,507	1.29	0.1
mPFC	**Respiratory cycle time**	39,780	1.53	$2x10^{-2}$*	39,780	2.04	$2x10^{-4}$***
	USV	1,20	3.16	0.1	1,20		
	Respiratory cycle time x USV	39,780	1.09	0.3	39,780	1.99	0.2
PIR	**Respiratory cycle time**	39,741	5.72	$1x10^{-7}$***	39,741	1.56	$2x10^{-2}$*
	USV	1,19	0.15	0.70	1,19	0.62	0.4
	Respiratory cycle time x USV	39,741	2.65	$4x10^{-7}$***	39,741	1.30	0.1

Gamma band		Freezing			Escape		
Structure	**Factor**	**F (ddl)**	**F value**	**p value**	**F (ddl)**	**F value**	**p value**
BLA	**Respiratory cycle time**	39,507	11.06	$1x10^{-6}$***	39,507	7.58	$1x10^{-7}$***
	USV	1,13	0.41	0.5	1,13	3.79	$7x10^{-2}$
	Respiratory cycle time x USV	39,507	5.28	$1x10^{-6}$***	39,507	3.65	$1x10^{-7}$***
mPFC	**Respiratory cycle time**	39,780	11.65	$1x10^{-6}$***	39,780	22.08	$1x10^{-7}$***
	USV	1,20	1.05	0.3	1,20	6.95	$2x10^{-2}$*
	Respiratory cycle time x USV	39,780	5.03	$1x10^{-6}$***	39,780	5.64	$1x10^{-7}$***
PIR	**Respiratory cycle time**	39,741	13.36	$1x10^{-6}$***	39,741	16.11	$1x10^{-7}$***
	USV	1,19	0.27	0.6	1,19	9.03	$7x10^{-3}$*
	Respiratory cycle time x USV	39,741	7.72	$1x10^{-6}$***	39,741	4.31	$1x10^{-7}$***

Figure 8-1

Figure 8-1*: Beta (upper table) and Gamma (lower table) bands maximum power throughout the respiratory cycle, ANOVA analysis. * : $p \leq 5x10^{-2}$, ** : $p \leq 5x10^{-3}$, *** : $p \leq 5x10^{-4}$.*

Etude 2 : Encodage des durées et activités oscillatoires au sein du circuit neuronal de la peur

Illustration par John Tenniel du Lapin blanc dans ***Alice au pays des merveilles*** (de Lewis Carroll, 1865). Dans ce roman, la symbolique du temps est grandement présente, notamment à travers le personnage du Lapin blanc et sa montre à gousset.

Introduction à la perception du temps et des durées

La deuxième étude de ce travail de thèse est consacrée à l'encodage des durées dans le conditionnement de peur. En effet, lors du conditionnement de peur, le rat apprend non seulement que le stimulus conditionnel prédit l'arrivée du choc, mais également à quel moment précis le choc arrive (Figure 41). Cet encodage des relations temporelles qui lient les deux stimuli serait à la base même de l'apprentissage associatif et se ferait dès les premiers essais. Or les tâches utilisées classiquement chez l'animal pour étudier la représentation du temps et la mémoire temporelle se basent sur des protocoles incluant une réponse instrumentale de l'animal et nécessitant de très nombreuses séances d'entrainement, ce qui empêche l'observation des comportements temporels dès les premiers essais de l'apprentissage.

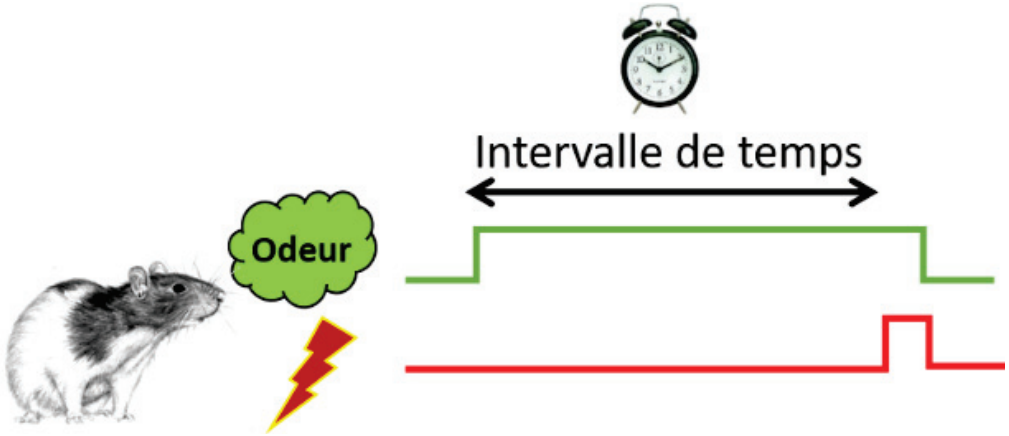


Figure 41 : *Représentation schématique de la notion d'intervalle de temps dans un conditionnement de peur à l'odeur.*

Afin de pallier cet inconvénient, nous avons choisi d'étudier l'encodage des durées dans le conditionnement de peur. Cela a nécessité de quantifier de façon très fine le comportement de l'animal, afin de détecter des réponses anticipatrices pendant l'intervalle étudié. Pour cela, nous avons utilisé un dispositif expérimental mis au point dans l'équipe, basé sur l'enregistrement simultané du freezing, des USV et de la respiration de l'animal pendant l'apprentissage (Hegoburu et al, 2011).

Nous avons ensuite recherché quelles étaient les signatures électrophysiologiques de cet encodage du temps dans le réseau neuronal de la peur conditionnée. Je me suis plus particulièrement focalisée sur l'étude des activités oscillatoires au sein de ce réseau.

Avant de présenter les résultats de cette étude, nous allons définir la notion de mémoire temporelle, ce que l'on connait du réseau impliqué et du rôle des activités oscillatoires au sein de ce réseau.

I. Que savons-nous du temps ? Comment le mesurer ?

« Qu'est-ce que en effet que le temps ? Qui saurait en donner avec aisance et brièveté une explication ? (…) Si personne ne me pose la question, je le sais ; si quelqu'un pose la question et que je veuille expliquer, je ne sais plus (…) Et cependant, Seigneur, nous percevons les intervalles de temps; nous les comparons entre eux, et nous appelons les uns plus longs, les autres plus courts. Nous mesurons encore de combien tel temps est plus long ou plus court ».

Saint Augustin, Confessions, XI, 14, 16

1. Le temps à différentes échelles et la mémoire temporelle

Des yeux pour voir, un nez pour sentir, une langue pour goûter, … mais aucun organe ou récepteur sensoriel dédié à la perception et l'estimation temporelle ! Pourtant l'estimation du temps et des durées est une opération courante dans la vie de tous les jours et fondamentale pour la survie de l'organisme. C'est ce qui permet, avec la notion d'espace, de produire des réponses comportementales adaptées. On distingue classiquement différentes échelles allant des millisecondes au rythme circadien, en passant par une échelle de temps intermédiaire allant de quelques secondes à quelques minutes/heures (pour revue, voir Buhusi et Meck, 2005)(Figure 42).

L'échelle de temps des millisecondes (pour revue, Spencer et Ivry, 2013) est essentielle pour la coordination fine des mouvements, telle que celles impliquées dans la marche, le vélo, la parole ou encore lorsque l'on joue d'un instrument de musique. L'échelle de temps circadienne est celle concernant les durées approximant les 24 heures et est impliquée dans les rythmes journaliers comme la prise alimentaire, la régulation du cycle veille/sommeil, les taux hormonaux, etc (pour revue voir Gachon et al., 2004 ; Partch et al., 2014). L'échelle de temps intermédiaire, celle qui va nous intéresser par la suite, est celle des intervalles de temps de l'ordre de l'ordre de la seconde à la minute. Elle est classiquement désignée sous le terme « *Interval timing* » dans la littérature. C'est celle qui nous permet d'encoder la manière dont les évènements sont reliés les uns aux autres dans le temps, créant ainsi des cartes temporelles de notre environnement (Miller et Barnet, 1993 ; Balsam et Gallistel, 2009) et nous permettant d'interagir de manière appropriée avec celui-ci en utilisant notre mémoire temporelle. L'*interval timing* fait référence par exemple aux processus impliqués dans la perception et l'estimation de la durée d'un évènement. Ce processus peut être implicite et non conscient. Par exemple, nous nous rendrons vite compte que le feu rouge en bas de chez nous que l'on connait bien, est bien plus long à passer au vert qu'habituellement, il se peut qu'il soit cassé. Pourtant nous n'avons jamais réellement mesuré le temps que celui-ci met à passer au vert, nous l'avons fait de manière inconsciente et en avons fait cette déduction. Mais il peut également s'agir d'un processus explicite et conscient. Par exemple, lorsque nous

estimons qu'il nous reste assez de temps pour traverser la route sur le passage piéton avant que le feu ne passe au vert pour les voitures.

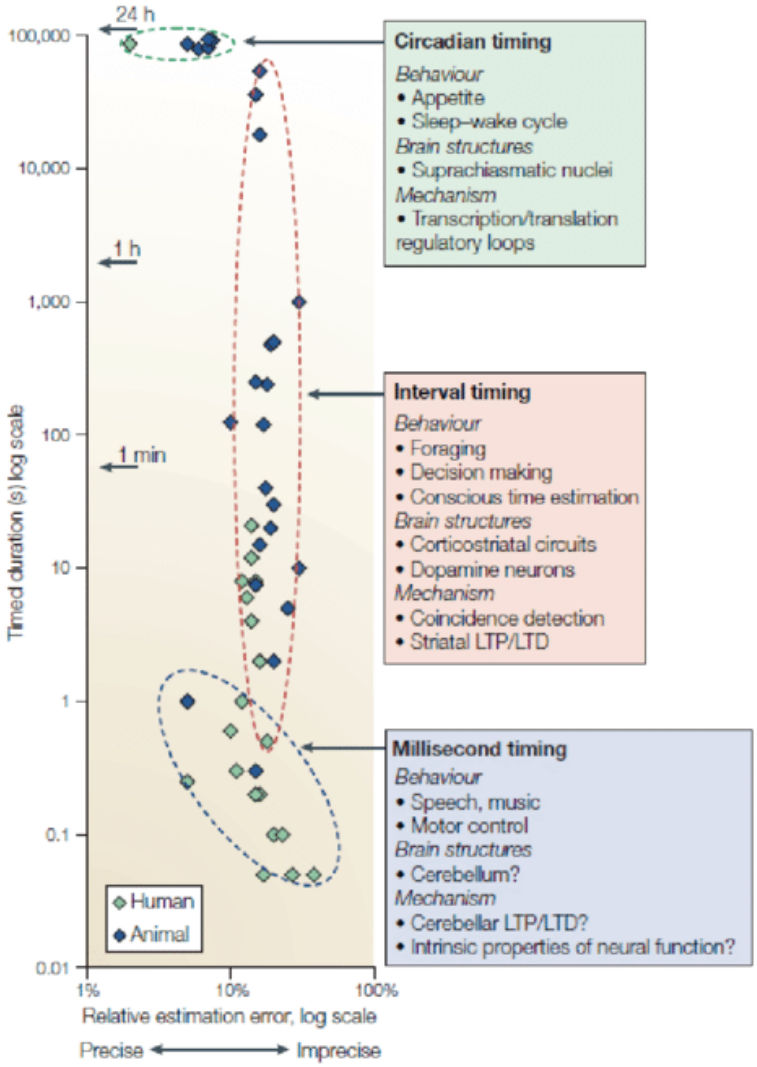


Figure 42 : *La perception temporelle à travers différentes échelles de temps. Est représentée ici la précision de l'estimation temporelle en fonction de la durée à mesurer. Trois échelles de temps sont définies : les millisecondes, les intervalles de temps (quelques minutes à une heure) et les rythmes circadiens (plusieurs heures). La performance est précise (mais peu flexible) pour des durées de l'ordre de la journée, moins précise (mais plus flexible) pour les intervalles de la seconde à l'heure et accepte une précision intermédiaire pour des durées de l'ordre de la milliseconde (Buhusi et Meck, 2005).*

Ces trois échelles de temps présentent des caractéristiques différentes. Premièrement, elles semblent dépendre de réseaux neuronaux différents (pour revue voir Merchant et al., 2014 ; Dibner et al., 2010). Une autre différence est que l'échelle circadienne est très précise (sur une échelle de 24h, seulement quelques minutes de variabilité) mais peu flexible (Czeilser et al., 1999) alors que pour l'*interval timing* c'est l'inverse (flexible mais peu précis, et cette précision décroit avec la durée de l'intervalle, c'est la propriété scalaire que nous décrirons plus bas (Buhusi et Meck, 2005).

Par ailleurs, l'*interval timing* permet de s'adapter à une nouvelle durée d'intervalle quasi instantanément (Meck et Church, 1984), contrairement à l'échelle circadienne pour laquelle il faut plusieurs jours d'adaptation (qui n'a jamais connu le fameux jet lag, ce temps de réadaptation à un autre cycle jour/nuit ?).

2. La propriété scalaire

$$I = k \cdot \log(S) \qquad et \qquad \frac{\Delta I}{I} = k$$

Equation 1 : *Loi de Weber-Fechner.* I *l'intensité de la sensation,* S *la grandeur du stimulus,* k *une constante,* log *est la fonction logarithme et* ΔI *le seuil différentiel (la plus petite différence d'intensité perçue). Fechner énonça sa célèbre loi selon laquelle « la sensation varie comme le logarithme de l'excitation », toutefois, la fraction de Weber (à droite) est censée être constante. Cette loi peut s'appliquer à différentes modalités, comme la vision, l'audition, … et également à la perception temporelle.*

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la perception temporelle obéit aux lois de la perception sensorielle, en ce sens qu'elle suit la loi psychophysique de Weber de par sa propriété scalaire (Gibbon 1977 ; Gibbon et al., 1984) (Equation 1). Cette propriété stipule que la précision temporelle décroit avec la durée de l'intervalle mesuré. Par exemple, il est plus difficile de discriminer un intervalle de 30 versus 32 secondes qu'un intervalle de 2 versus 4 secondes, bien que dans les deux cas, 2 secondes séparent les intervalles. Cette propriété scalaire signifie que l'on maintient la même précision relative sur une large gamme de durée (le coefficient de variation est proportionnel à la durée de l'intervalle). Ce qui se traduit mathématiquement par la fraction de Weber qui est constante (Equation 1, droite). Si l'on représente sur une échelle de temps relative les courbes représentant les comportements temporels mesurés, celles-ci se superposent (Figure 43). En revanche, cette propriété scalaire n'est plus respectée lorsque les tâches deviennent trop complexes (Keen et Machado, 1999) ou si elles mettent en jeu des durées extrêmes (pour revue voir Lejeune et Wearden, 2006).

Cette loi n'est pas la seule à régir la perception temporelle. Par exemple, la loi de Vierordt (1868, cité dans Szelag & al., 2002) montre que les durées brèves, de l'ordre d'une seconde ou inférieures, sont surévaluées et les durées plus longues, supérieures à 4/5 secondes, sont sous-évaluées. Les durées de 2 à 3 secondes sont les mieux évaluées.

Nous ne nous étendrons pas plus sur les différents aspects et lois psychophysiques de la perception et l'estimation temporelle, ce n'est pas le propos ici, il faut juste garder à l'esprit qu'elles existent et sont utiles en expérimentation pour vérifier si les observations sont bien liées à des processus de traitement temporel.

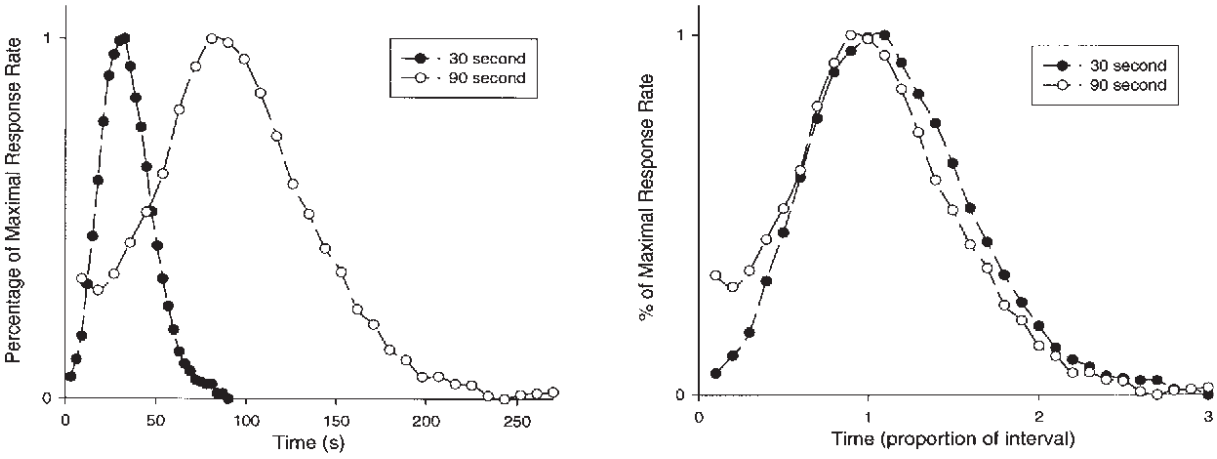


Figure 43 : *Décours temporel d'un comportement suivant la propriété scalaire. Les rats ont été entrainés à presser un levier à un moment précis (après 30 ou 90 secondes après un stimulus sonore) pour obtenir une récompense. Chaque courbe présente un pic au temps optimal pour obtenir la récompense mais la précision est meilleure pour 30 que 90 secondes (visible par la largeur moins importante du pic). B) En revanche, si le temps est présenté de manière relative à l'intervalle cible, les courbes se superposent, montrant ainsi que la précision de la perception temporelle est proportionnelle à l'intervalle à mesurer (Matell et Meck, 2000).*

3. Les différentes tâches utilisées pour étudier la mémoire temporelle

Pour étudier la mémoire temporelle, différentes tâches ont été développées à la fois chez l'homme et chez l'animal (pour revue voir Coull et Nobre, 2008), certaines où il est nécessaire de connaitre/estimer la durée de l'intervalle pour réussir la tâche comportementale demandée (tâche explicite), d'autres où cette mesure temporelle n'est pas utile à la réalisation correcte de la tâche, mais où l'encodage de la durée est automatique (tâche implicite). Quelle que soit la tâche utilisée, la mise en évidence d'un encodage du temps repose souvent sur un indice comportemental.

a. Conditionnement opérant : Procédure de renforcement à intervalle fixe (FI)

Dans les protocoles d'apprentissage temporel, des variantes de la « boite de Skinner » (1938) dont nous avons parlé dans le chapitre 1 de l'introduction générale peuvent être utilisées. Dans ce type de tâches, l'animal doit effectuer une action motrice, généralement appuyer sur un levier, pour obtenir une récompense.

Dans la procédure de renforcement à intervalle fixe (FI, de l'anglais Fixed Interval), une boulette de nourriture est délivrée à intervalle fixe à l'animal à condition qu'il presse le levier au terme de cet intervalle. Au tout début, l'animal presse continuellement le levier pour obtenir une récompense, puis il apprend que cette récompense n'est obtenue que lorsque le levier est pressé à un moment précis de l'intervalle, il optimise alors sa réponse comportementale et ne presse le levier que vers la fin de l'intervalle appris (Lejeune 1992) (Une représentation des courbes comportementales que l'on peut obtenir dans cette tâche a été vu en (Figure 43).

Une variante de ce protocole est la tâche de Peak interval (PI) (Roberts 1981), qui consiste à introduire dans la procédure de FI des essais non renforcés, c'est à dire des essais où la récompense n'est pas délivrée. Ce protocole permet de mesurer le pattern temporel de la réponse comportementale sans qu'il soit altéré par l'arrivée du stimulus inconditionné. La courbe du nombre d'appuis sur levier présente un pic au moment où la récompense était attendue. La largeur du pic permet d'estimer la précision avec laquelle l'animal estime la durée, et le pattern de la courbe suit la propriété scalaire (Matell et Meck, 2000).

b. Procédure de bissection temporelle : discrimination temporelle

Dans cette tâche, le sujet apprend à discriminer deux durées différentes, une considérée comme longue et l'autre considérée comme courte, et à chacune des durées est associée une réponse motrice particulière. Par exemple, pour la durée courte, le sujet doit appuyer sur le levier droit, pour la durée longue, c'est le levier gauche. Des durées intermédiaires sont ensuite introduites que le sujet doit catégoriser en longue ou courte en donnant une réponse motrice (Church et Deluty, 1977). On peut alors mesurer le point subjectif d'équivalence des durées, c'est-à-dire la durée pour laquelle le sujet répond aussi souvent « long » que « court ». La pente de la courbe peut aussi être calculée, permettant ainsi l'estimation de la précision avec laquelle le sujet perçoit ces durées (Figure 44).

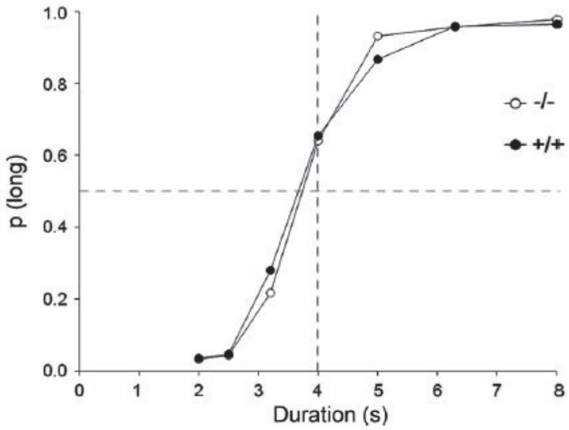


Figure 44 : *Exemple de courbe obtenue dans une tâche de bissection temporelle. La probabilité de répondre « long » est tracée en fonction de la durée de l'intervalle présenté (Höhn et al. 2011).*

L'inconvénient des tâches explicites présentées ci-dessus, c'est qu'elles demandent un très grand nombre d'essais avant que l'animal puisse exprimer une réponse comportementale reflétant l'apprentissage de la durée de l'intervalle. Or il semble que l'apprentissage du lien temporel entre les stimuli se produise très tôt lors d'un conditionnement. Certains auteurs suggèrent même que cet encodage des durées des intervalles entre stimuli est à la base de l'apprentissage associatif (Balsam et al., 2010). Dans le paragraphe suivant nous allons illustrer le fait que si l'on utilise les mesures comportementales appropriées, il est possible de mettre en évidence un apprentissage très précoce de la durée des intervalles.

c. *Conditionnement associatif*

C'est dans un conditionnement auditif appétitif chez le chien que Pavlov (1927) avait observé que si l'on introduisait un délai entre le moment où la clochette sonne et le moment où le chien reçoit la récompense, la salivation était retardée et n'apparaissait que juste avant le moment où la nourriture était présentée. Le chien était donc capable d'encoder la durée de cet intervalle, et cela se traduisait par une optimisation de sa réponse comportementale.

Dans le conditionnement de peur, différentes études ont montré que l'animal apprend non seulement l'association entre le stimulus conditionné et le stimulus inconditionné, mais également la durée de l'intervalle qui sépare la présentation des deux stimulus. Ainsi, Drew et al (2005) ont réalisé un conditionnement aversif chez le poisson rouge, dans lequel un choc électrique était délivré 5 secondes après l'allumage d'un signal lumineux. Sur quelques essais de la séance, la lumière était maintenue pendant 45 secondes et le choc n'était pas délivré, ce qui a permis d'observer le décours temporel de la réponse conditionnée au cours de l'apprentissage. Les résultats de cette étude montrent que dès les premières séances de conditionnement, la réponse conditionnée (mesurée par le niveau d'activité de l'animal) est maximale au temps prédit d'arrivée du choc (5 secondes). Lors des séances suivantes, l'amplitude de cette réponse augmente, mais pas sa latence d'apparition. Les auteurs en concluent que les durées sont apprises au tout début du conditionnement.

Un autre exemple a été apporté par Davis et al. (1989) chez le rat, dans une étude utilisant un protocole de peur conditionnée à un stimulus visuel, semblable à celui utilisé par Drew et al (2005). Le niveau de peur conditionnée de l'animal était ensuite mesuré par le test de sursaut potentialisé par la peur (fear-potentiated startle). Le principe de cette mesure est le suivant : l'amplitude du réflexe de sursaut normalement observé en réponse à un son brusque est augmentée lorsque le test est réalisé en présence d'un indice préalablement associé à un choc nociceptif (Brown et al, 1951). L'étude de Davis et al. (1989) a montré que la réponse de sursaut était potentialisée de façon maximale lorsque le test était effectué à un temps correspondant à la durée de l'intervalle lumière-choc utilisé lors du conditionnement. De plus les auteurs rapportent que, dans certaines conditions, cette spécificité temporelle peut être obtenue après seulement une seule association SC-SI. Dans une étude récente, Diaz-Mataix et al (2013) ont utilisé le processus de reconsolidation mnésique pour mettre en évidence un encodage rapide des durées chez le rat. En effet, il est maintenant bien établi que la réactivation d'une mémoire de peur consolidée rend cette mémoire labile et induit différents processus de plasticité dans l'amygdale, nécessaires à la reconsolidation de cette mémoire (Nader et al, 2000). Certains auteurs ont émis l'idée que les processus de reconsolidation sont mis en jeu préférentiellement lorsque l'épisode de réactivation contient de nouvelles informations par rapport à l'apprentissage initial, nécessitant ainsi une actualisation de la mémoire originelle (Lee et al, 2009). Diaz-Mataix et al (2013) se sont basés sur ces observations pour réaliser l'expérience suivante : les rats étaient entrainés dans un apprentissage de peur conditionnée au son et lors de l'épisode de réactivation, les animaux étaient soumis à un seul essai son-choc, dans lequel la durée de l'intervalle entre le son et le

choc était modifiée (10 secondes au lieu de 30 secondes dans l'apprentissage initial). Cette réactivation a induit des processus de plasticité dans l'amygdale, qui sont le reflet du déclenchement d'une reconsolidation de la mémoire. Les auteurs ont vérifié que ces phénomènes n'étaient pas observés lorsque la durée de l'intervalle son-choc n'était pas modifiée lors de la réactivation. Cette étude montre donc de façon indirecte que les animaux sont capables de détecter (et donc d'encoder) un changement de durée en un seul essai.

Enfin, dans notre équipe, cette question a été abordée en mettant en œuvre une analyse fine du comportement de l'animal dans un conditionnement de peur à l'odeur. Pour cela, trois paramètres sont enregistrés en parallèle pour affiner la mesure de la réponse de peur de l'animal : la réponse de freezing, la respiration et les vocalisations ultrasoniques (Hegoburu et al, 2011). Utilisant cette approche, Shionoya et al. (2013) ont montré que le décours temporel de la fréquence respiratoire était un bon indice de l'encodage de la durée de l'intervalle odeur-choc et permettait d'objectiver un encodage temporel après quelques essais de la séance d'apprentissage. Ce résultat a été confirmé par Boulanger et al (2014) sur de jeunes ratons.

Ces données suggèrent donc que l'apprentissage de la relation temporelle entre deux stimuli se fait en même temps que l'apprentissage de l'association elle-même. Les intervalles de temps semblent être encodés automatiquement et ce, dès les premiers essais, et la connaissance de ces intervalles semble être essentielle à l'apprentissage de cette association (Balsam et Gallistel, 2009). Il faut noter toutefois que certains auteurs ne vont pas dans ce sens, et considèrent que ce sont deux processus séparés (Delamater et al., 2014).

Dans le paragraphe suivant, nous allons présenter les structures qui semblent impliquées dans cet encodage du temps, le modèle prédominant proposé dans la littérature ainsi que les corrélats électrophysiologiques qui en découlent.

II. Neurobiologie de la mémoire temporelle

A l'heure actuelle, il est admis que l'encodage du temps ne dépend pas d'une zone cérébrale spécifique, d'une horloge centrale, comme le suggérait Keele et al (1985), mais qu'il serait présent de façon ubiquitaire dans le cerveau, comme un ensemble d'horloges locales qui seraient différemment activées selon la nature du stimulus ou la tâche impliquée (Karmarkar et Buonomano, 2007). Plusieurs structures font aujourd'hui consensus quant à leur implication dans les processus d'encodage du temps : le striatum, la BLA, le PFC, l'hippocampe et les cortex sensoriels. Ces structures interagiraient au sein d'un réseau lors des processus d'encodage du temps.

1. Striatum

De nombreuses études montrent l'implication des ganglions de la base dans le traitement de l'information temporelle. Parmi eux, une structure en particulier semble critique : le striatum dorsal. Tout d'abord, dans certaines pathologies affectant le striatum et la transmission dopaminergique, on peut observer des déficits de traitement temporel. Par exemple dans la maladie de parkinson qui affecte la transmission dopaminergique (Harrington et al., 2011 ; Parker et al, 2013) ou encore dans la maladie de Huntington où le striatum dégénère (Paulsen et al, 2004), on observe des déficits dans la perception et l'estimation du temps qui accompagnent d'autres déficits cognitifs.

Par ailleurs, des études d'imageries cérébrales chez le sujet sain, montrent que le striatum est activé dès lors que l'on demande au sujet de réaliser une tâche temporelle (pour revue Coull et al., 2011). De même chez l'animal, il a été montré dans notre équipe par la technique de marquage métabolique au 2-DG, que le striatum était activé dans le conditionnement de peur à l'odeur incluant un intervalle fixe entre l'odeur et le choc (Boulanger-Bertolus et al, 2014).

De plus, des rats avec des lésions du striatum dorsal ou de la substance noire pars compacta se comportent comme s'ils avaient une perception très altérée du temps (Matell et al., 2000). Dans une tâche de peak interval, la lésion du striatum dorsal empêche la production de la réponse temporelle (le pic observé sur les courbes que nous avons décrit précédemment est altéré) (Meck, 2006b). Ceci est observé aussi par Mattell et al (2003), qui lèsent le striatum chez le rat et qui observent que ceux-ci appuient sur le levier beaucoup plus tardivement que ne le font les rats contrôles (sans lésion) pour recevoir une récompense. De la même façon, si l'on inhibe l'activité du striatum lors d'une tâche de discrimination temporelle par une injection d'un agoniste GABAergique, on bloque les capacités de discrimination des durées de l'animal (Gouvêa et al., 2015).

Corroborant ces données, un grand nombre d'études électrophysiologiques ont été réalisées chez l'animal, où l'activité des neurones du striatum pendant des tâches temporelles est enregistrée. De cette façon, Apicella et al. (1992) ont montré chez le singe une activation des neurones du striatum vers la fin d'un intervalle, lorsque l'attente de la récompense est maximale. Chez le rat soumis à une tâche de peak interval, on retrouve le même type de résultat avec 22% des neurones du striatum présentant un pic d'activité juste avant la fin de l'intervalle à encoder (Matell et al., 2003). D'autres données électrophysiologiques montrent une activité en rampe des neurones. Cette activité est caractérisée par des neurones qui déchargent de plus en plus (ou inversement de moins en moins) au cours de l'intervalle. Généralement, on dit que l'activité en rampe est prédictive des actions, puisqu'elle débute souvent quelques secondes avant que l'animal n'initie son action (Parker et al., 2014 ; Kim et al., 2013 ; Xu et al., 2014). Par exemple, dans une tâche où l'animal reçoit un stimulus lumineux après lequel il doit attendre 5 secondes avant d'effectuer une réponse motrice, Donnelly et

al. (2015) ont observé cette activité en rampe dans le striatum au cours de l'intervalle de 5 secondes. Lorsque l'animal n'attend pas 5 secondes avant d'effectuer la réponse motrice, cette activité apparait plus précocement. De plus, si l'animal n'exécute aucune action motrice, cette activité disparait. Plus récemment, Emmons et al. (2017) ont également observé cette activité en rampe dans le striatum au cours d'une procédure de renforcement à intervalle fixe chez le rongeur, activité dont le décours temporel est dépendant de la durée de l'intervalle à encoder. Mello et al. (2015) ont montré également un autre type d'activité des neurones du striatum chez le rat, qui déchargent en réponse à des intervalles de temps spécifiques par rapport à l'arrivée d'une récompense attendue. Cette activation séquentielle des neurones permet même de modéliser l'estimation temporelle de l'animal. Des résultats similaires ont été obtenus par Gouvêa et al (2015) qui montrent que l'on peut prédire la durée d'un intervalle de temps en observant l'activité des neurones du striatum.

L'ensemble de ces données électrophysiologiques montrent que les neurones du striatum présentent une activité dont le décours temporel est en lien avec la durée de l'intervalle utilisé, suggérant l'implication de la structure dans l'encodage du temps.

Le striatum reçoit des afférences dopaminergiques de la substance noire pars compacta (SNc). C'est ce système dopaminergique qui modulerait l'estimation temporelle (pour revue sur le rôle de la dopamine dans la mémoire temporelle, voir Agostino et Cheng (2016)). En effet, une lésion de la SNc chez le rat induit les mêmes effets sur le décours temporel du comportement qu'une lésion du striatum. Ce comportement est restauré suite à l'administration d'un agoniste des récepteurs dopaminergiques (Meck, 2006b). De façon générale, une injection d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs dopaminergiques altère la perception temporelle à la fois chez l'animal (Drew et al. 2003) et chez l'homme (pour une revue, voir Coull et al. 2011).

2. Cortex préfrontal

Le striatum n'est pas la seule structure qui est critique dans les processus de mémoire temporelle, le cortex préfrontal serait également impliqué. En effet, chez l'homme notamment, il est activé dans un grand nombre de tâche impliquant la mémoire temporelle (Coull et al. 2011), et sa lésion entraîne une diminution de la précision dans des tâches nécessitant un contrôle temporel (Koch et al., 2002; Picton et al., 2006). On retrouve ces résultats chez les rongeurs, où une inactivation du cortex frontal médian augmente les erreurs de détection temporelle au cours d'une tâche ou l'animal doit maintenir un levier appuyé pendant une certaine durée (Narayanan et al., 2006). De plus, l'inactivation du cortex frontal médian par injection de muscimol chez le rat altère également la capacité à discriminer deux durées dans une tâche de bissection temporelle (Kim et al., 2009).

Des enregistrements électrophysiologiques montrent que, au niveau populationnel, les neurones du cortex préfrontal médian contiennent une information précise sur le temps

écoulé (Matell et al. 2003; Kim et al. 2013). De plus, on observe dans le cortex préfrontal des neurones présentant une activité en rampe comme celle décrite plus haut pour les neurones du striatum. Par exemple, dans l'étude de Donnelly et al. (2015) où l'animal doit fournir une réponse motrice après un certain intervalle de temps, on observe pendant cet intervalle une activité en rampe des neurones du mPFC corrélée à la performance comportementale de l'animal. Cette activité en rampe a aussi été observée dans une procédure de renforcement à intervalle fixe (Emmons et al., 2017). En outre, Xu et al. (2014) ont constaté dans une tâche de discrimination de durées, que l'activité unitaire dans le mPFC était modulée au cours de l'estimation temporelle, et que cette modulation était proportionnelle à la durée de l'intervalle à estimer.

A l'image de ce qui avait été observé pour le striatum, on retrouve également dans le cortex préfrontal une modulation dopaminergique de la perception temporelle. Ainsi la modulation de la durée subjective de l'intervalle induite par l'injection systémique de drogues dopaminergiques est bloquée par la lésion du cortex frontal empêche (Meck, 2006a) et l'injection d'agonistes dopaminergiques dans le cortex frontal perturbe la mémoire temporelle (Parker et al. 2015). Narayanan et al. (2012) ont pu préciser que c'était les récepteurs D1, et non les récepteurs D2, qui étaient impliqués dans le traitement temporel.

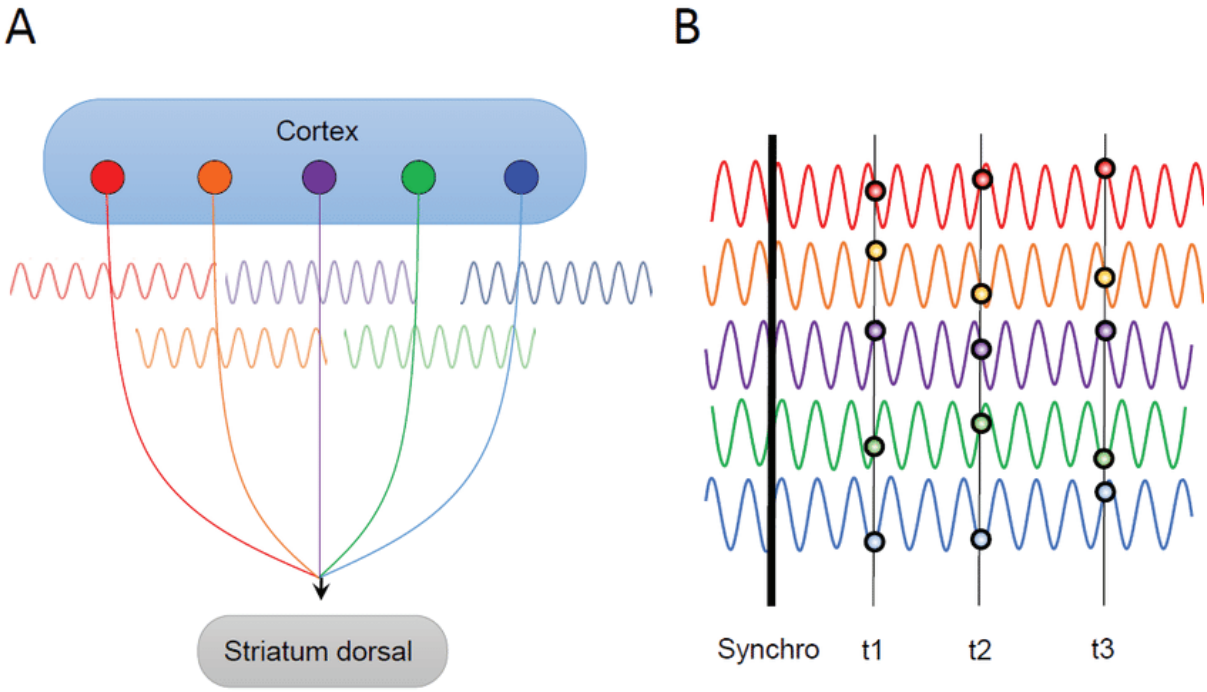


Figure 45 : *Schéma explicatif du modèle Striatal Beat Frequency (SBF). A. Les oscillateurs corticaux oscillant chacun à des fréquences variables se projettent sur les neurones épineux du striatum dorsal. B. Au début d'un intervalle à mesurer, un signal dopaminergique synchronise la phase des oscillateurs corticaux. La durée de l'intervalle est alors mesurée par « l'image » formée par l'ensemble des phases des oscillateurs et détectée par le striatum dorsal (adapté par Julie Boulanger-Bertholus à partir de Buhusi et Meck, 2005).*

Ainsi, la triade cortex préfrontal, striatum dorsal et dopamine serait impliquée dans la perception et la mémorisation des intervalles de temps. En particulier, une plasticité de la voie

préfronto-striatale, impliquant le système dopaminergique, semble nécessaire à une perception précise du temps (Höhn et al. 2011). Un modèle de référence concernant les réseaux impliqués dans la mémoire temporelle est le modèle Striatal Beat Frequency (SBF ; Matell et Meck, 2000; Buhusi et Meck, 2005) (Figure 45). Le modèle SBF met en jeu la boucle cortico-striato-thalamique habituellement impliquée dans des tâches motrices et cognitives (Arnsten et Rubia, 2012). Les neurones corticaux se projettent sur les neurones épineux GABAergiques du striatum (McGeer et al., 1977). Ces neurones corticaux oscillent à des fréquences variables et les neurones épineux du striatum détectent la phase de chacun des oscillateurs pour ainsi construire à chaque instant, une image représentative du temps. Il y a donc une intégration de l'activité des neurones corticaux par le striatum. A chaque début d'intervalle de temps à encoder, le modèle impose un recalage des oscillateurs corticaux, ce qui les synchronise entre eux et permet que l'image représentative du temps pour un intervalle donné soit reproductible (Kononowicz, 2015). C'est la dopamine qui jouerait ce rôle de synchronisateur. En effet, Parker et al. (2014) ont mis en évidence une augmentation de l'activité oscillatoire dans la bande thêta dans le cortex préfrontal pendant l'intervalle qui serait le reflet d'une augmentation de la synchronisation des différents oscillateurs. Cette augmentation est altérée par l'injection d'antagonistes D1-dopaminergiques, qui induit également une perturbation de l'activité en rampe des neurones du cortex préfrontal ainsi que du comportement des animaux dans la tâche temporelle.

3. Amygdale

Malgré le fait que le modèle SBF se focalise sur le réseau fronto-striatal, des évidences de l'implication d'autres structures pouvant jouer un rôle modulateur sur ce réseau ont été mises en avant. Des études récentes ont ainsi montré que l'amygdale serait impliquée dans la perception temporelle.

Différentes études ont permis d'aboutir à cette conclusion. Tout d'abord, il est bien connu dans la littérature que l'amygdale est impliquée dans la détection des erreurs de prédiction qui se produisent dans un apprentissage associatif lorsque le stimulus inconditionné est omis ou lorsqu'il est présenté de façon inattendue. Par exemple, Belova et al. (2007) montrent que le taux de décharge des neurones de l'amygdale est modulé par la détection d'une erreur de prédiction. Roesch et al. (2010) décrivent également une augmentation de la réponse des neurones de l'amygdale lorsque la récompense attendue par l'animal est omise. Certains auteurs ont tiré parti de ce phénomène pour évaluer de façon indirecte l'implication de l'amygdale dans l'encodage du temps. Ainsi, Herry et al. (2007) mettent en évidence chez la souris, une augmentation du taux de décharge ainsi que du marquage c-fos des neurones de l'amygdale en réponse à une séquence temporelle imprédictible, mais pas pour une séquence temporelle imprédictible. Díaz-Mataix et al (2013) ont réalisé une expérience originale basée sur un conditionnement de peur au son, et dans laquelle ils ont montré que la modification de l'intervalle son-choc entraîne une reconsolidation de la mémoire de peur déjà formée qui

dépend d'une phase de synthèse protéique dans l'amygdale. Comme le phénomène de reconsolidation ne se produit que lorsque les animaux détectent une différence par rapport à ce qu'ils attendent (Lee, 2009), ces données montrent que le changement de la durée de l'intervalle son-choc a bien été détecté par les animaux, et que cette détection implique l'amygdale. Utilisant un protocole de conditionnement de peur au son chez le chat, Paré et Collins (2000) montrent que le taux de décharge des neurones de l'amygdale augmente de façon graduelle en anticipation du choc, et que la réponse au son est maximale au moment où le choc est attendu. Bermudez et al. (2012) ont également confirmé chez le singe macaque, que les neurones de l'amygdale présentent une augmentation graduelle de leur activité pendant la présentation du stimulus conditionné.

Comme c'est le cas pour le striatum et le cortex préfrontal, ce rôle de l'amygdale dans l'encodage du temps impliquerait une modulation dopaminergique (Schultz, 2013). Effectivement, si l'on injecte un antagoniste des récepteurs dopaminergiques D1 dans l'amygdale juste avant une séance de conditionnement de peur à l'odeur, on observe une altération du comportement temporel des rats (Shionoya et al., 2013). De plus, une lésion de l'amygdale et des afférences dopaminergiques du striatum latéral dans une tâche de bissection temporelle conduit à une altération de la précision de la mémoire temporelle (Es-seddiqi et al., 2016).

L'ensemble de ces études montrent que l'amygdale est impliquée dans l'encodage des durées. L'amygdale envoie et reçoit des projections d'un grand nombre de structures, notamment celles impliquées dans l'interval timing. En effet, il existe des connections réciproques entre le mPFC et l'amygdale (McDonald, 1991 ; McDonald et al. 1996). L'amygdale envoie également des projections sur le striatum (Kelley et al., 1982 ; McDonald, 1991), et plus spécifiquement sur le striatum dorso-médian qui reçoit également les afférences du cortex prélimbique (Voorn et al. 2004; Gabbott et al. 2005). De ce fait, elle occupe une place centrale qui lui permettrait d'orchestrer les processus d'encodage du temps. Ainsi, il a été montré que les interactions entre le PFC et l'amygdale seraient impliquées dans les processus d'encodage du temps (Matthews et al., 2012 ; Meck et MacDonald, 2007) et l'interaction entre ces deux structures et la substance périaqueducale interviendrait dans la détection des irrégularités temporelles (Li et McNally, 2013).

4. Hippocampe

Un ensemble de données expérimentales ont été obtenues confortant également la place de l'hippocampe dans les processus de traitement temporel (pour revue, voir Eichenbaum, 2014).

Tout d'abord, différentes études basées sur une approche lésionnelle ont montré que la lésion de l'hippocampe chez le rongeur altère la justesse et la précision de l'estimation temporelle de la réponse conditionnée dans les tâches de bissection temporelle et de « peak interval » (Meck et al, 1984 ; Olton et al, 1987 ; Tam et al. 2015). Des données recueillies par

le groupe d'Howard Eichenbaum ont par ailleurs montré que la lésion de l'hippocampe entraîne une perturbation de la mémoire temporelle pour des intervalles de l'ordre de plusieurs minutes, dans une tâche d'apprentissage de séquences d'odeurs (Fortin et al, 2002 ; DeVito et Eichenbaum, 2011), une observation confirmée par Jacobs et al. (2013).

En complément de l'approche lésionnelle, des études électrophysiologiques ont confirmé le rôle de l'hippocampe dans l'encodage temporel. Ainsi, Deshmukh et Bhalla (2003) ont montré sur des rats anesthésiés soumis à des stimulations olfactives séparées les unes des autres par différents intervalles de temps, que les neurones hippocampiques présentaient des réponses sélectives de la durée de l'intervalle. Par la suite, MacDonald et al. (2011, 2013) ont mis en évidence des séquences temporelles spécifiques de décharge des neurones hippocampiques au cours de l'intervalle entre deux stimuli dans un conditionnement associatif non spatial. Les activités de ces cellules, que les auteurs ont appelé « time-cells » par opposition aux « place cells », semblent refléter la dimension temporelle reliant les évènements les uns aux autres. Une étude récente utilisant la technique d'imagerie calcique montre qu'une même population de neurones de l'hippocampe peut encoder l'information temporelle sur de multiples échelles de temps (Mau et al, 2018). L'ensemble de ces données électrophysiologiques suggèrent que l'hippocampe peut garder une trace du temps écoulé entre deux stimuli.

L'hippocampe est connecté aux différentes structures impliquées dans l'encodage du temps. Ainsi l'hippocampe ventral se projette de façon unidirectionnelle sur le mPFC majoritairement (Rosene et Van Hoesen, 1977; Hoover et Vertes, 2007). D'autre part, il existe des interactions bidirectionnelles entre le mPFC et l'hippocampe ventral et dorsal mais de façon indirecte, avec comme potentiel relai le noyau reuniens du thalamus (Vertes, 2006; Cassel et al., 2013). L'hippocampe reçoit également des projections de l'amygdale (Pikkarainen et al., 1999). Enfin, le striatum et l'hippocampe sont connectés via le PFC.

Si l'on essaye de se replacer dans le contexte du modèle SBF, il existe plusieurs rôles que pourrait jouer l'hippocampe (Yin et Troger, 2011). Premièrement, il pourrait être impliqué dans un mécanisme de feedback qui permettant de mettre à jour continuellement la « temporal expectancy » en interagissant avec des structures corticales. Ensuite, comme nous l'avons précédemment décrit, l'activité de ces neurones corticaux est intégrée par les neurones épineux du striatum. Une autre hypothèse sur le rôle de l'hippocampe dans ce modèle serait celle de modulateur du seuil de décharge de ces neurones épineux via une inhibition tonique ou une excitation phasique. Enfin, une autre hypothèse serait que l'hippocampe aurait une action en aval des neurones épineux, en régulant la traduction des informations temporelles en sortie motrice.

5. Cortex sensoriels

Nous avons présenté un ensemble d'aires associatives qui semblent critiques dans l'encodage du temps et la mémoire temporelle. Or, le temps est parti intégrante de notre expérience sensorielle et un nombre croissant d'études proposent des mécanismes de perception temporelle distribués dans le cerveau et notamment dans les aires sensorielles elles même (pour revue voir Bueti, 2011).

Chez l'Homme, Bueti et al (2010) utilisant la technique d'IRM fonctionnelle dans une tâche temporelle visuelle, montrent que l'anticipation temporelle de stimuli visuels est encodée dans un réseau distribué qui inclut le cortex visuel primaire et les aires visuelles extrastriées. De plus la dynamique d'activité dans ces aires est corrélée avec le niveau d'anticipation temporelle. Le même type de résultats a été obtenu chez le singe par Ghose et Maunsell (2002) qui montrent que l'activité des neurones de l'aire V4 du cortex visuel reflète l'anticipation temporelle des stimuli signifiants pour l'animal. Chez le rat une partie des neurones du cortex visuel primaire du rat déchargent en anticipation de l'arrivée de la récompense (Shuler et Bear, 2006). De même, si l'on considère l'olfaction, Li et al. (2014) ont montré que les neurones du bulbe olfactif transmettent aux centres supérieurs une information liée à la durée du stimulus perçu. De plus, dans notre équipe, Hegoburu et al. (2009) ont observé dans le cortex olfactif primaire (cortex piriforme) une augmentation de la libération de Glutamate et de Gaba rythmée par la durée des intervalles de temps utilisés dans un conditionnement de peur à l'odeur, et qui persiste même en l'absence des stimuli.

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

III. Activités oscillatoires et mémoire temporelle

Au vu du réseau distribué impliqué dans l'encodage temporel, le recueil des activités oscillatoires via l'enregistrement des LFP dans différentes structures en parallèle se présente comme une approche pertinente pour étudier la dynamique des interactions au sein de ce réseau. Il y a cependant encore peu d'études utilisant cette approche chez l'animal dans des tâches temporelles, et nous allons les décrire ci-dessous.

En utilisant une tâche de discrimination temporelle où l'animal doit comparer un stimulus d'une durée de 1 seconde versus un stimulus d'une durée de 3 secondes, Nakazono et al. (2015) ont observés une augmentation maintenue de la puissance dans la bande de fréquence thêta (4-9Hz) dans l'hippocampe. Ce résultat suggère que l'hippocampe pourrait être impliqué lorsque l'animal doit comparer la durée en mémoire et celle qu'on lui présente, et qu'il doit alors prendre la décision de décider si ce sont les mêmes durées (ou au contraire, ces durées sont différentes). Parker et al. (2014) ont utilisé une tâche temporelle opérante à intervalle

fixe chez le rat et ont montré l'émergence d'une activité à la fréquence 4Hz dans le cortex préfrontal médian pendant l'intervalle. Cette activité oscillatoire à 4Hz ainsi que les performances comportementales temporelles de l'animal sont perturbées par l'infusion locale d'un antagoniste des récepteurs D1 dopaminergiques, qui altère également l'activité en rampe des neurones du cortex préfrontal médian en lien avec le comportement de timing des animaux et cohérente à l'activité oscillatoire à 4Hz.

Quelques études réalisées dans le conditionnement pavlovien ont mis en évidence de façon indirecte des changements d'activités au cours d'un intervalle signifiant. Ainsi, dans un conditionnement de trace appétitif chez le chat, dans lequel un stimulus visuel prédit une récompense alimentaire après un délai, Bauer et al. (2007) ont mis en évidence une augmentation d'activité dans la bande de fréquence gamma dans le cortex rhinal et l'amygdale, qui culmine dans la partie tardive du stimulus et le délai qui précède la récompense. Paré et Collins (2000) utilisant un conditionnement de peur au son chez le chat montrent que pendant l'anticipation du stimulus nociceptif, le taux de décharge des neurones de l'amygdale latérale augmente et leur activité se synchronise au rythme de la fréquence thêta. Dans un conditionnement aversif au son chez le rat, il a été observé qu'au cours du stimulus sonore, il y avait une diminution de la puissance dans la bande de fréquence gamma ainsi qu'une augmentation de la puissance dans la bande de fréquence thêta dans le cortex auditif (Headley et Weinberger, 2011).

Certaines études se sont penchées plus spécifiquement sur les changements de cohérence entre différentes structures du réseau impliqué dans l'encodage du temps, permettant d'étudier la connectivité fonctionnelle entre structures du réseau (voir chapitre 3 de l'introduction générale). Ainsi dans un conditionnement pavlovien appétitif dans lequel un son prédit l'arrivée d'une récompense, Popescu et al (2009) ont observé une augmentation de cohérence dans la bande gamma entre l'amygdale basolatérale et le striatum pendant la présentation du son, avec un pic de cohérence au moment où la récompense est censée être délivrée. Chez la souris, lors d'un conditionnement de peur au son et plus particulièrement lors de la présentation du stimulus sonore conditionné, Pape et al (2005) ont mis en évidence une augmentation progressive de la corrélation entre l'hippocampe et l'amygdale latérale dans la bande thêta. Dans ces deux études, la question du codage temporel n'était pas directement adressée par les protocoles utilisés, et les observations faites sur les changements d'activité ne peuvent donc pas être rigoureusement attribués à des processus temporels stricto sensu. Une étude récente a abordé cette question en utilisant une tâche temporelle basée sur un conditionnement aversif auditif dans lequel le début du son est le seul prédicteur de l'arrivée du choc (Dallérac et al, 2017). Les données de cette étude mettent en évidence des changements de puissance du signal LFP dans la bande 3-6Hz dans l'amygdale et le striatum pendant l'intervalle son-choc de 30s. Point important, lorsque la durée de l'intervalle est changée (10s au lieu de 30s) le décours temporel de la puissance est également modifié et suit le comportement de l'animal. Les auteurs ont en outre étudié les changements de cohérence entre les activités oscillatoires recueillies dans ces deux structures dans la bande

3-6Hz et observé que là encore leur décours temporel était modifié si la durée de l'intervalle changeait. Cette étude suggère que la voie de projection entre l'amygdale et le striatum est impliquée dans l'encodage des durées dans le conditionnement de peur.

Hormis cette dernière étude, il n'y a à ce jour aucune donnée sur la dynamique neuronale au sein du réseau de structures impliquées dans l'encodage du temps dans un conditionnement pavlovien. Dans ma deuxième étude de thèse, nous avons abordé cette question dans le conditionnement de peur à l'odeur, afin de mieux comprendre les interactions au sein de ce réseau de structures.

- **Cette étude a donné lieu à la rédaction d'un manuscrit en vue d'une soumission prochaine :**

Dupin M, Garcia S, Messaoudi B, Doyère V, Mouly AM.
Neural network dynamics associated with interval timing in odor fear conditioning
In preparation

Publication 2

Neural network dynamics associated with interval timing in odor fear conditioning

Maryne Dupin[1],1 Samuel Garcia[1], Belkacem Messaoudi[1], Valérie Doyère[2] and Anne-Marie Mouly[1]

[1]Lyon Neuroscience Research Center, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1028, Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5292, University Lyon 1, Lyon 69366, France

[2]Institut des Neurosciences Paris-Saclay, CNRS, UMR 9197, Université Paris-Sud - Université Paris-Saclay, Orsay, France.

ABSTRACT

Interval timing refers to the ability to time intervals ranging from seconds to minutes, and guides fundamental animal behaviors like the anticipation of rewarding or aversive events. In pavlovian fear conditioning, in which a conditioned stimulus predicts the arrival of an aversive unconditioned stimulus, a few studies have shown that the animal encodes the time interval between the two stimuli. This has led some authors to propose that these temporal relations are automatically encoded, and are the foundation of associative learning. Yet the temporal basis of interval timing at the early stages of aversive conditioning remains poorly investigated. Here we used a fine-grain behavioral approach based on respiration recording, to detect timed anticipatory fear responses in an odor fear conditioning paradigm in rats, while recording brain oscillatory activities. For this, animals were implanted with electrodes in the medial prefrontal cortex (mPFC), basolateral amygdala (BLA), dorsomedial striatum (DMS) and olfactory piriform cortex (PIR). The animals were trained in a first session with a 20s odor-shock interval duration, then in a second training session, the interval duration was shifted to 30s. We investigated the temporal patterns of respiration frequency together with the time course of theta (5-15Hz) and gamma (40-80Hz) band activity power during the odor-shock interval. We found that respiratory frequency temporal curve was modified by the shift to a new interval duration, as were theta activity power temporal curves in the four recording sites. In contrast, although gamma activity power was globally increased during the odor-shock interval, the temporal curves were only modulated by interval duration in the mPFC. Together these data suggest that at early stages of associative learning, temporal behavior can be observed through respiration rate analysis, which correlates with temporal patterns of oscillatory activities in a wide network for the theta band and in a more restricted network for the gamma band.

INTRODUCTION

Interval timing refers to the ability to time intervals ranging from seconds to minutes, and guides fundamental animal behaviors like the anticipation of rewarding or aversive events. Although the neural mechanisms underlying timing remain unknown, several studies in the literature reported dynamically changing patterns of activity that contain information about elapsed time since a given stimulus. This property has been found in multiple brain areas including the dorsal striatum and the prefrontal cortex (Coull et al, 2011; Buhusi and Meck, 2005). Recent studies suggest that the amygdala also plays a role in interval timing (Diaz-Mataix et al, 2013; Shionoya et al, 2013; Dallérac et al, 2017) and regulates its physiological correlates of plasticity in the striatum thanks to direct amygdala projections to the striatum (Dallérac et al, 2017). In addition, evidence of time encoding has been found in different sensory cortices like the primary visual cortex (Shuler and Bear, 2006; Bueti et al, 2010) and the olfactory piriform cortex (Hegoburu et al, 2009).

According to the striatal beat-frequency (SBF) model that is the dominant model for temporal processing, cortical neurons fire in an oscillatory fashion to form representations of stimuli, and medium spiny striatal neurons integrate cortical oscillatory patterns of activity and act as coincidence detectors when an aversive or appetitive US is presented (Matell and Meck, 2004). A primary assumption of this model is that striatal inputs, in particular afferents from the prefrontal cortex, are continuously updated in a way that allows for the scalar property. Indeed the hallmark of interval timing is that the error in estimating a duration is proportional to the duration to be timed, a property known as scalar timing (Gibbon and Church, 1990).

A classical method in the literature for assessing interval timing in animals is the peak procedure (Roberts, 1981). In this task, animals are trained to press a lever for food reward after a specific amount of time has elapsed since the onset of a stimulus. Critically, responding is also assessed on non-rewarded probe trials in which the duration of the stimulus is usually longer than for rewarded trials. Responding averaged over these test trials gradually increases and peaks at a point centered close to the actual reward time before then falling off somewhat more gradually. This distribution of responding is taken as a strong indication that the animal has encoded when the reward is expected to occur. Although this procedure leads to clear-cut temporal curves that are modified in a manner that respects the scalar property when the interval duration is changed, this task necessitates numerous training sessions and involves a motor response from the animal. Yet some studies show that in associative learning, animals learn to time the arrival of reward from the onset of conditioning (Davis et al., 1989; Arcediano et al., 2003; Drew et al., 2005; Diaz-Mataix et al., 2013; Shionoya et al, 2013; Boulanger-Bertolus et al, 2014) and such temporal encoding has been suggested to be a fundamental component of associative learning (Balsam and Gallistel, 2009). However, the neurobiological basis of interval timing in pavlovian associative learning remain poorly understood.

In the present study, we investigated the neural network dynamics occurring during an odor fear conditioning paradigm. In this paradigm, an initially neutral odor signals the arrival of an aversive mild foot-shock at a fixed time interval. In a previous study, we measured the animal's respiratory rate in this task and showed that it was is a good index of interval timing as

respiratory frequency curves present temporal patterns that are linked to the duration of the interval to be timed (Shionoya et al, 2013). Here, rats were implanted with four recording electrodes in the median prefrontal cortex (mPFC), basolateral amygdala (BLA), dorsomedial striatum and piriform cortex (PIR). During training, their respiration was measured, together with ultrasonic vocalizations (USV) and fear immobility called freezing. We analyzed the time course of theta (5-15Hz) and gamma (40-80Hz) oscillatory activities collected during the odor-shock interval, because previous studies have shown timing-related changes in these two frequency bands (Headley et Weinberger, 2011; Dallérac et al, 2017 ; Popescu et al, 2009; Parker et al, 2014).

METHODS

Animals

Data were obtained from thirty male Long Evans rats (250-270g at their arrival, Janvier Labs, France). They were housed individually at 23◦C and maintained under a 12 h light–dark cycle (lights on from 8:00 am to 8:00 pm). Food and water were available ad libitum. All experiments and surgical procedures were conducted in strict accordance with the European Community Council Directive of 22nd September 2010 (2010/63/UE) and the national ethics committee (APAFIS#10606). Care was taken at all stages to minimize stress and discomfort to the animals. Some of the behavioral and electrophysiological data collected on these animals have been used in a previous study (Dupin et al, 2019).

Surgery

Animals were anesthetized with Equithesin, a mixture of chloral hydrate (127 mg/kg, i.p.) and sodium pentobarbital (30 mg/kg, i.p.), and placed in a stereotaxic frame (Narishige, Japan) in a flat skull position. The level of anesthesia was held constant with regular injections of Equithesin throughout the experiment. Monopolar stainless steel recording electrodes (100 µm in diameter) were then stereotaxically implanted in the left hemisphere in the four brain areas: mPFC (AP: +3.0mm; L: +0.8mm; DV: -3.5mm), DMS (AP : +1.2mm, L : +2.2mm, DV : -3.5mm), PIR (AP: -1.8, L: +5.5mm, DV: -8 mm) and BLA (AP : -2.8mm, L : +4.9mm, DV : -7.5mm). Accurate positioning in the PIR was achieved using the characteristic profiles of evoked field potential induced in the PIR in response to electrical stimulation of the olfactory bulb (Haberly, 1973). For this, a bipolar stimulation electrode (made of two 100-µm stainless-steel wires with a tip separation of 500 µm) was lowered transiently in the olfactory bulb to facilitate positioning in the PIR and withdrawn thereafter. A reference electrode was screwed in the skull above the right parietal lobe. The four recording electrodes were connected to a telemetry transmitter (rodentPACK system, EMKA Technologies, Paris, France) fixed to the rat’s skull surface by dental acrylic cement and anchored with a surgical screw placed in the frontal bone. The animals were allowed to recover for two weeks following surgery.

Experimental apparatus

The apparatus has been described in detail in a previous study (Hegoburu et al., 2011). It consisted of a whole body customized plethysmograph (diameter 20 cm, height 30 cm, Emka Technologies, France) placed in a sound-attenuating cage (L 60 cm, W 60 cm, H 70 cm, 56dB background noise). The plethysmograph was used to measure respiratory parameters in behaving animals. The ceiling of the plethysmograph was equipped with a tower allowing the introduction of a condenser ultrasound microphone (Avisoft-Bioacoustics CM16/CMPA, Berlin, Germany) to monitor USV emitted by the rats. The bottom of the animal chamber was equipped with a shock floor connected to a programmable Coulbourn shocker (Bilaney Consultants GmbH, Düsseldorf, Germany). Three Tygon tubing connected to a programmable custom olfactometer were inserted in the tower on the top of the plethysmograph to deliver air and odorants. Deodorized air flowed constantly through the cage (2 L/min). When programmed, an odor (McCormick Pure Peppermint; 2 L/min; 1:10 peppermint vapor to air) was introduced smoothly in the air stream through the switching of a solenoid valve (Fluid automation systems, CH-1290 Versoix, Switzerland) thus minimizing its effect on change in pressure. The bottom of the animal chamber had a port connected to a ventilation pump which could draw air out of the plethysmograph (at a rate of up to 2 L/min) thus maintaining a constant airflow that did not interact with the animal's breathing pattern. Animal's behavior was monitored with two video cameras on the walls of the sound-attenuating cage.

Fear conditioning paradigm (Figure 1A)

After the recovery period, the animals were handled individually and placed in the experimental apparatus for 30 min per day during 3 to 4 days before the beginning of the experiments in order to familiarize them with being manipulated and connected to the telemetry transmitter.

For the conditioning session, the telemetry transmitter was plugged onto the animal's head and the rat was allowed free exploration during the first 4 min, then an odor was introduced into the plethysmograph cage for 20s (Group 20s, n=21) or 30s (Group 30s, n=9), the last second of which overlapped with the delivery of a 0.4mA foot-shock (1s). The animal received ten odor-shock trials, with an intertrial interval of 4 min. After the last pairing, the transmitter was unplugged and the animal returned to its home cage.

The conditioned fear response was assessed during a retention test carried out 48h after conditioning. For the retention test, the rat was placed in the experimental cage (equipped with new visual cues and with a plastic floor to avoid contextual fear expression) and allowed a 4-min odor-free period. The CS odor was then presented five times for 20s with a 4-min intertrial interval.

Two weeks later, animals in Group 20s were submitted to a second conditioning session during which the initial 20s-odor-shock interval was shifted to 30s. The animal was connected to the telemetry recording system and received ten 30s-odor-shock trials. After the last pairing, the transmitter was unplugged and the animal returned to its home cage.

Data acquisition and preprocessing

The respiratory signal collected from the plethysmograph was amplified and sent to an acquisition card (MC-1608FS, Measurement Computing, USA; Sampling rate = 1000 Hz) for storage and offline analysis. The detection of the respiratory cycles was achieved using an algorithm described in a previous study (Roux et al., 2006). This algorithm performs two main operations: signal smoothing for noise reduction, and detection of zero-crossing points to define accurately the inspiration and expiration phase starting points. Momentary respiratory frequency was determined as the inverse of the respiratory cycle (inspiration plus expiration) duration.

The video signals collected through the two cameras were transmitted to a video acquisition card and a homemade acquisition software. Offline, freezing behavior defined as the absence of any visible movement except that due to breathing (Blanchard and Blanchard, 1969), was automatically detected using a Labview homemade software and further verified by an experimenter (for a detailed description, see Dupin et al, 2019).

For USV recording, the ultrasound microphone was connected to a recording interface (UltraSoundGate 116 Hb, Avisoft-Bioacoustics) with the following settings: sampling rate = 214285 Hz; format = 16 bit (Wohr et al., 2005). Recordings were transferred to Avisoft SASLab Pro (version 4.2, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) and a Fast Fourier Transform (FFT) was conducted. Spectrograms were generated with an FFT-length of 512 points and a time window overlap of 87.5% (100% Frame, FlatTop window). These parameters produced a spectrogram at a frequency resolution of 419 Hz and a time resolution of 0.29 ms. The acoustic signal detection was provided by an automatic whistle tracking algorithm with a threshold of −20 dB, a minimum duration of 0.01 s and a hold time of 0.02 s. However, the accuracy of detection was verified trial by trial by an experienced user. The main parameters used in the present study were extracted using Avisoft SASLab Pro and concerned the duration as well as the start and end time of USV calls. No band pass filter has been applied during USV recording. Although a few 50-kHz USV were observed, in the present study we focused on 22-kHz USV.

Local field potentials (LFP) were collected by telemetry via a four-channel wireless miniature transmitter (<5.2g, RodentPack EMKA Technology). LFP signals were amplified (x1000), filtered (between 0.1 and 100 Hz), digitized (sampling frequency: 1000 Hz) and stored on a computer for offline analysis. The LFP signals were first individually inspected in order to eliminate artifacts due to signal saturation or transient signal loss. The selection was made for each recording site separately and proceeded as follows: when the duration of an artifact exceeded 5s over the 60s post-shock recording, the trial was excluded. When the number of excluded trials exceeded 5 (out of the 10 trials) then the recording site was excluded for this animal. This procedure led to the following number of animals per recording site: BLA, n=17; PFC, n=20; PIR, n=20; DMS, n=19 for Group 20s; BLA, n=6; PFC, n=8; PIR, n=8; DMS, n=9 for Group 30s.

Data analysis (Figure 1B)

The different data (respiration, USV, behavior, LFP signals) were synchronized offline via a TTL synchronization signal generated at the beginning of each experimental session. Once synchronized, the data were analyzed using custom-written scripts under Python.

The temporal course of respiratory frequency and LFP signal power during the 20s odor-shock interval was assessed during the training sessions. For each animal, the instant respiratory frequency was averaged second by second for each trial of the training session. The resulting curves were averaged across the trials for a given animal and then averaged among animals of the same experimental group.

The power spectral density (PSD) of the LFP signals was calculated using the continuous Morlet wavelet transform (Kronland-Martinet et al., 1987). The Morlet wavelet estimated the amplitude of the signal at each time and frequency bin. Two frequency bands were identified for the subsequent analyses: theta (5-15Hz) and gamma (40-80Hz), and the mean power in each band was calculated second by second. The resulting values were normalized to baseline defined as the average power over the 20s preceding odor onset. The LFP power curves obtained for each recording site were averaged across the trials for a given animal and then averaged among animals of the same experimental group.

During the training sessions, the average amount of Freezing and USV during the Odor-Shock interval was measured and expressed as a percentage of the sampled period total duration. Freezing and USV rates were averaged across the trials for a given animal and then averaged among animals of the same experimental group.

During the retention test, the strength of the learning was assessed by measuring the duration of the animal's freezing response before introduction of the odor, and during each odor presentation. The obtained values were then expressed as a percentage of the sampled period total duration, averaged across the trials for a given animal and averaged among animals of the same experimental group.

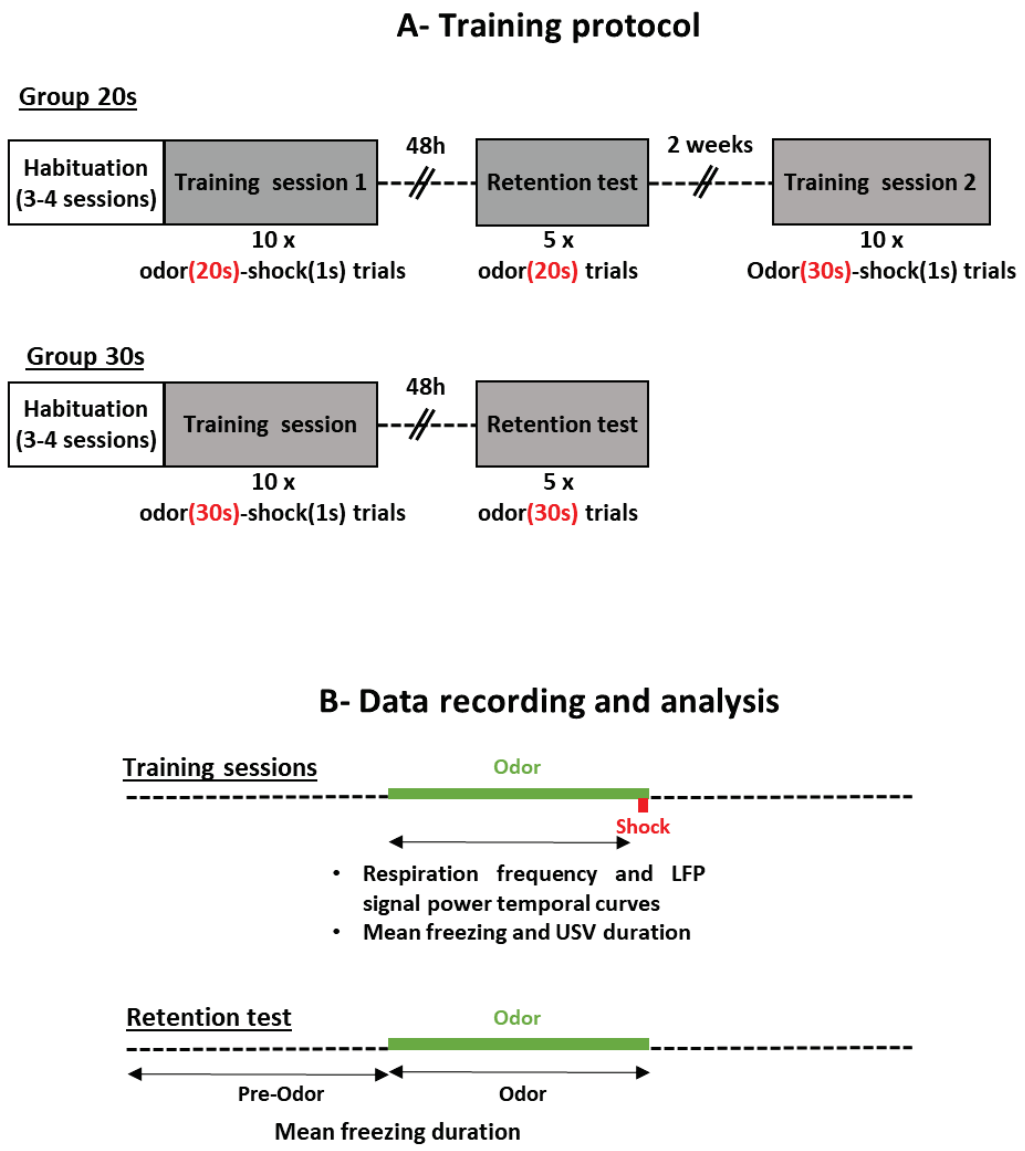


Figure 1: *A) Training protocol. Group 20s: The animals were trained with 10 Odor-Shock pairings using a 20s Odor-Shock interval (Training session 1). 48h hours later, they were tested for their retention of the learning and received 5 presentations of the learned odor. Two weeks later they were trained with 10 Odor-Shock pairings using a 30s Odor-Shock interval (Training session 2). Group 30s: The animals were trained with 10 Odor-Shock pairings using a 30s Odor-Shock interval (Training session). 48 h later, they were tested for their retention of the learning and received five presentations of the learned odor. B) Data recording and analysis. Training sessions: in the two groups, during the odor-shock interval, local field potentials (LFP), respiration, ultrasonic vocalizations and freezing behavior were recorded, synchronized and analyzed as described in the text. Retention test: freezing before and during odor presentation was quantified.*

Statistical analysis

All analyses were performed with Systat 13.0® software. For each test, the significance level was set at $p<0.05$.

In Group 20s, the temporal curves of respiratory frequency and LFP signal power observed during the Odor-shock interval in the two training sessions, were compared using a two-way

ANOVA with Interval duration (20s or 30s) and Time (1s to 18s) as repeated measures factors. Posthoc pairwise comparisons were then carried out when allowed by the ANOVA results.
The temporal curves of respiratory frequency and LFP signal power observed during the first training session in Group 20s and Group 30s, were compared using a two-way ANOVA with Interval duration (20s or 30s) as an independent factor and Time (1s to 18s) as a repeated measures factor. Posthoc pairwise comparisons were then carried out when allowed by the ANOVA results.
In Group 20s, the mean freezing and USV durations observed during the Odor-shock interval in the two training sessions were compared between using a two-way ANOVA with Group (Good Timers or Bad Timers) as an independent factor and Interval duration (20s or 30s) as a repeated measures factor. Posthoc pairwise comparisons were then carried out when allowed by the ANOVA results.
In Group 20s, during the retention test, the learned fear response to the odor was analyzed using a two way ANOVA with Group (Good Timers or Bad Timers) as an independent factor and Period (Pre-odor vs Odor) as a repeated measures factor. Posthoc pairwise comparisons were then carried out when allowed by the ANOVA results.

Histology

At the end of the experiment, the animals were killed with a lethal dose of pentobarbital, their brains were removed, postfixed, cryoprotected in sucrose (20%). The brains were then sectioned (40µm coronal slices) for verification of electrodes tips by light microscopy. Areas targeted by the electrodes in the four implanted brain regions have been reported on brain atlas coronal sections (Figure 1-1).

RESULTS

Respiratory frequency is a good index of interval timing providing the level of stress is not too high

In a previous study (Shionoya et al, 2013) we showed that respiration is a good index of interval timing in non-implanted animals. We assessed if this was still true for implanted animals, in which the level of stress could be higher and might constrain the respiratory response.
The time course of respiratory frequency during the odor-shock interval in Group 20s was compared between the first training session where a 20s interval was used, and the second session for which the interval was shifted to 30s (Figure 2A). The ANOVA revealed no significant effect of Interval ($F_{1,20}$=0.62, p=0.44), but a significant effect of Time ($F_{17,340}$=14.96, p<0.0001) and a significant IntervalxTime interaction ($F_{17,340}$=2.45, p<0.0001).
However based on individual curves inspection, it occurred that two subgroups of animals could be distinguished, those presenting clearly different temporal curves (Subgroup Good Timers, n=11) and those presenting similar curves for 20s and 30s intervals (Subgroup Bad Timers, n=10). We therefore decided to analyze these animals separately and the data are presented on Figure 2B. In the Good Timers Subgroup (Figure 2B, left), the ANOVA revealed

no significant effect of Interval ($F_{1,10}$=0.01, p=0.99), but a significant effect of Time ($F_{17,170}$=15.95, p<0.0001) and a significant IntervalxTime interaction ($F_{17,170}$=3.414, p<0.0001). A significant interaction between interval duration and elapsed time indicates that the time course of the respiratory frequency changes is affected by the duration of the interval. In the Bad Timers Subgroup (Figure 2B, right), the ANOVA revealed no significant effect of Interval ($F_{1,9}$=1.65, p=0.23), a significant effect of Time ($F_{17,153}$=4.35, p<0.0001) but no significant IntervalxTime interaction ($F_{17,153}$=1.56, p=0.08).

The temporal patterns observed in Good Timers Subgroup suggest that the Odor-Shock interval was timed according to the scalar rule (Gibbon, 1977) in both conditions. In order to assess scalar timing quantitatively, the time axis for the 30-s data was multiplicatively rescaled so that the 18 time bins during the interval for both groups represented the same proportions of elapsed time from odor onset to shock presentation. The scalar timing rule predicts superior superposition of the functions in relative time, compared to no rescaling. Figure 2C shows the rescaled group mean functions for both 20- and 30-s conditions, separately for Good Timers and Bad Timers subgroups. Superposition was indexed by eta-squared **(**η^2), a measure of the proportion of variance accounted for by the mean of the two functions (Brown et al., 1992). When superposition is perfect, η^2 is at its maximum value of 1. For Good Timers subgroup, η^2 was greater under the multiplicative transform (η^2=0.95, Figure 2C, left) than under no rescaling (η^2=0.89, Figure 2B, left). In contrast, for Bad Timers subgroup, η2 was greater under no rescaling (η^2=0.66, Figure 2B, right) than under the multiplicative transform (η^2=0.47, Figure 2C, right).

We next assessed whether the timing abilities assessed through respiration, could be related to the level of stress of the animals. We compared the global amount of freezing exhibited by the animals in the Good Timers and Bad Timers subgroups during the Odor-Shock interval in the two training sessions (Figure 3A, Left). The ANOVA revealed no significant effect of Subgroup ($F_{1,18}$=0.27, p=0.61) and Training session ($F_{1,18}$=0.27, p=0.61), but a significant Training sessionxSubgroup interaction ($F_{1,18}$=23.78, p<0.0001). Further pairwise comparisons showed that in Good Timers subgroup freezing amount decreased during the second session, while it increased in Bad Timers subgroup, suggesting that the animals in the two subgroups exhibited different coping strategies: more active for the former and more passive for the latter. We also compared the amount of USV rate in the two subgroups during the Odor-Shock interval. The ANOVA revealed a tendency for a significant effect of Subgroup ($F_{1,16}$=3.69, p=0.07), but no significant effect of Training session ($F_{1,16}$=0.04, p=0.85) and Training sessionxSubgroup interaction ($F_{1,16}$=0.04, p=0.85). The animals in the Bad Timers subgroup tended to emit more USV than in the Good Timers subgroup (p=0.06).

Finally, we assessed whether the two subgroups presented different levels of learned fear during the 48h retention test (Figure 3B). In each subgroup we compared the amounts of freezing observed before odor introduction and during odor. The ANOVA revealed no significant effect for Subgroup ($F_{1,18}$=0.06, p=0.82), but a significant effect of Period (Pre-Odor vs Odor; $F_{1,18}$=35.56, p<0.0001). In both subgroups, the amount of freezing was higher in

presence of the learned odor than before its delivery (p=0.001 for Good Timers; p=0.003 for Bad Timers), suggesting similar levels of learning in Bad Timers and Good Timers animals.

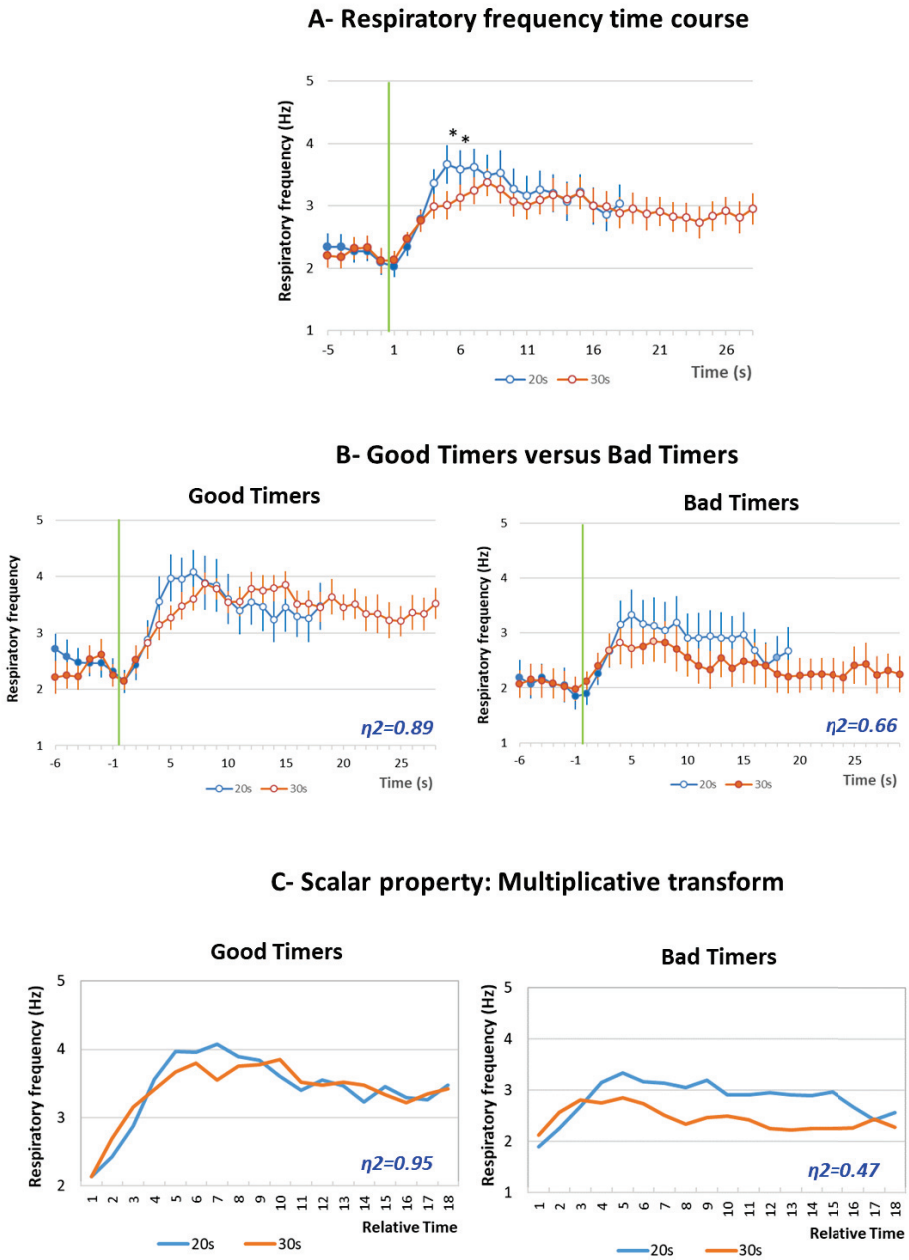


Figure 2: *A) Respiratory frequency time course. In Group 20s, the time course of respiratory frequency is represented with a 1-s bin precision, from 5s before odor onset (green vertical line) to shock arrival which occurs either at 20s (Training session 1, in blue) or at 30s (Training session 2, in orange). Open circles on each curve signal the values that are significantly different from the baseline (p < 0.05). *: significant between curves difference (p < 0.05). B) Good Timers versus Bad Timers groups subgroups. In Good Timers subgroup, the temporal patterns of respiratory frequency are modulated by the duration of the odor-shock interval, while in the Bad Timers subgroup, they are not. C) Scalar property test. In order to assess scalar timing quantitatively, in each subgroup the time axis for the 30-s data was multiplicatively rescaled. Superposition between the two curves was indexed by eta-square (η2) indicated in the bottom right of each graph.*

Together these data show that the temporal pattern observed in respiration rate in the Good Timers subgroup reflects the learning of Odor-Shock interval duration, and confirm our

previous finding that rats can learn the expected time of shock delivery within 10 conditioning trials (Shionoya et al, 2011). The ability to time interval duration, at least when looking at the respiratory rate, seems to depend on the animal's fear response: the higher the freezing and USV amounts, the lower the possibility for respiration to exhibit different temporal patterns related to interval duration. Finally, this difference in timing abilities has no impact on the strength of the fear memory as assessed 48h later.

In the next analyses, we assessed whether the differences observed in timing abilities in Bad Timers and Good Timers based on their temporal pattern of respiratory frequency, were associated with similar differences in oscillatory activity temporal patterns.

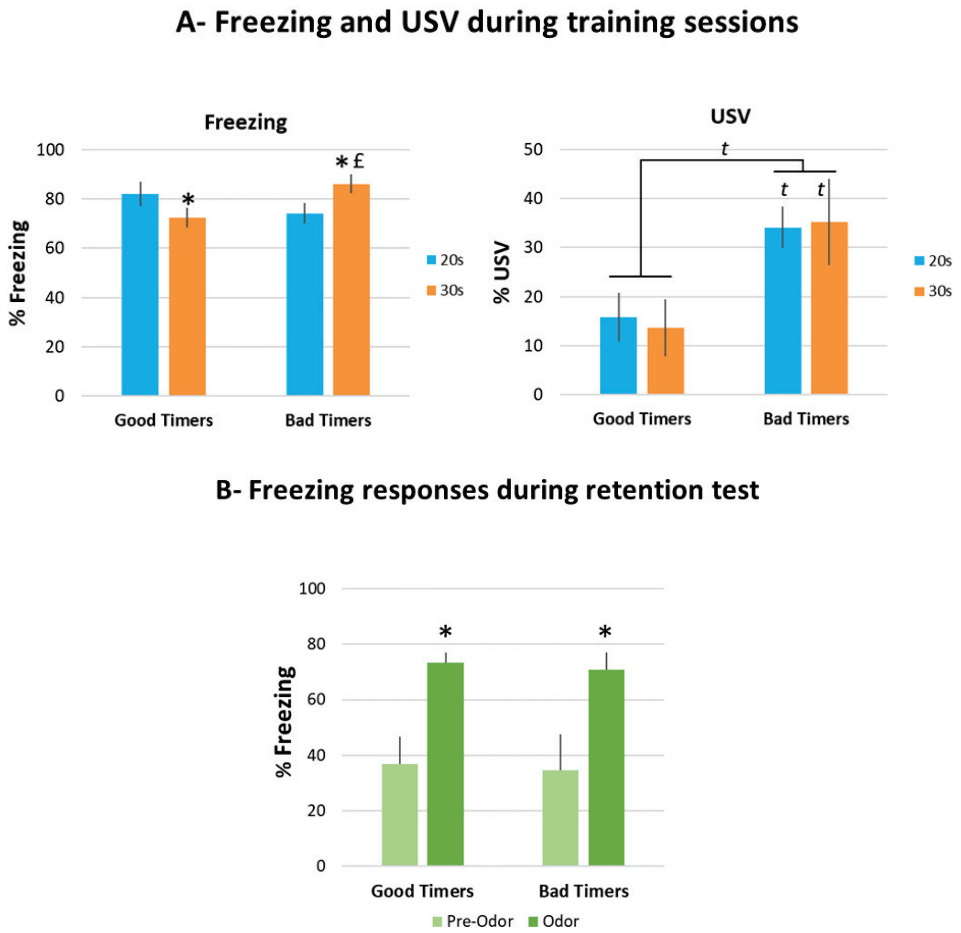


Figure 3: *A) Freezing and ultrasonic vocalizations (USV) during training sessions. In Good Timers and Bad Timers subgroups, Freezing and USV rates were measured during the 20s (in blue) and 30s (in orange) odor-shock intervals. * significant within group difference (p<0.05); £ significant between group difference (p<0.05); t between group difference tendency (p<0.07). B) Freezing responses during retention test. Good Timers and Bad Timers subgroups showed similar levels of freezing during the retention test. * significant difference with pre-odor period (p<0.05).*

Changes in oscillatory activity in the theta (5-15Hz) band

The temporal patterns of theta activity power during the Odor-Shock interval in Group 20s was compared between the first training session where a 20s interval was used, and the second session for which the interval was shifted to 30s. Figure 4 represents the temporal

curves obtained in the four recording sites in the Good Timers (Left side) and Bad Timers (right side) subgroups. The ANOVA carried out in the Good Timers subgroup revealed a significant effect of Time (mPFC: $F_{17,170}$=6.47, p<0.0001; BLA: $F_{17,102}$=6.73, p<0.0001; PIR: $F_{17,170}$=4.05, p<0.0001; DMS: $F_{17,170}$=6.18, p<0.0001), a significant IntervalxTime interaction (mPFC: $F_{17,170}$=2.88, p<0.0001; BLA: $F_{17,102}$=5.72, p<0.0001; PIR: $F_{17,170}$=3.76, p<0.0001; DMS: $F_{17,170}$=4.38, p<0.0001) and a significant effect of Interval for PIR ($F_{1,10}$=5.72, p=0.038) and DMS ($F_{1,10}$=7.06, p=0.024). In contrast in the Bad Timers subgroup, in the four recording sites, the ANOVA showed no significant effect of Interval, Time or IntervalxTime interaction, except a significant IntervalxTime interaction in the BLA ($F_{17,119}$=1.74, p=0.045).

These data suggest that in the Good Timers subgroup, the time course of theta activity power was affected by the duration of the interval to be timed. In order to assess scalar timing quantitatively, the time axis for the 30-s data was multiplicatively rescaled and the η^2 were calculated for each recording site (Figure 4-1). In mPFC and DMS, η^2 was greater under the multiplicative transform (Figure 4-1, right) than under no rescaling (Figure 4-1, left), while the reverse in observed for BLA and PIR.

These data show that in Good Timers animals, akin to what is observed for respiration frequency, the time course of theta activity power reflects the learning of Odor-Shock interval, at least in the mPFC and the DMS. In Bad Timers animals, theta activity power showed almost no change during the interval compared to baseline, except for the BLA.

Changes in oscillatory activity in the gamma (40-80Hz) band

The temporal patterns of gamma activity power during the Odor-Shock interval in Group 20s was compared between the first training session where a 20s interval was used, and the second session for which the interval was shifted to 30s. Figure 5 represents the temporal curves obtained in the four recording sites in the Good Timers (Left side) and Bad Timers (right side) subgroups. The ANOVA carried out in the Good Timers subgroup revealed no significant effect of Interval, but a significant effect of Time in mPFC ($F_{17,170}$=5.05, p<0.0001), PIR ($F_{17,170}$=2.47, p=0.002) and DMS ($F_{17,170}$=3.21, p<0.0001), and a significant IntervalxTime interaction in mPFC ($F_{17,170}$=2.40, p=0.002). In the Bad Timers subgroup, the ANOVA revealed a significant effect of Time in mPFC (F17,136=2.53, p=0.002), PIR (F17,136=2.49, p=0.002) and DMS (F17,119=2.77, p=0.001), but no significant effect of Interval nor IntervalxTime interaction in the four recording sites.

Therefore, in both Good Timers and Bad Timers, gamma power increased significantly during the interval compared to baseline, except for the BLA. When looking at the temporal patterns, the only structure in which the time course of gamma activity power was affected by the duration of the interval, was the mPFC in the Good Timers subgroup. In order to assess scalar timing, the time axis for the 30-s data was multiplicatively rescaled and the η2 was calculated (Figure 5-1). η^2 was greater under no rescaling (Figure 5-1, left) than under the multiplicative transform (Figure 5-1, right), suggesting gamma activity temporal pattern in mPFC does not uniquely reflect the learning of Odor-Shock interval duration.

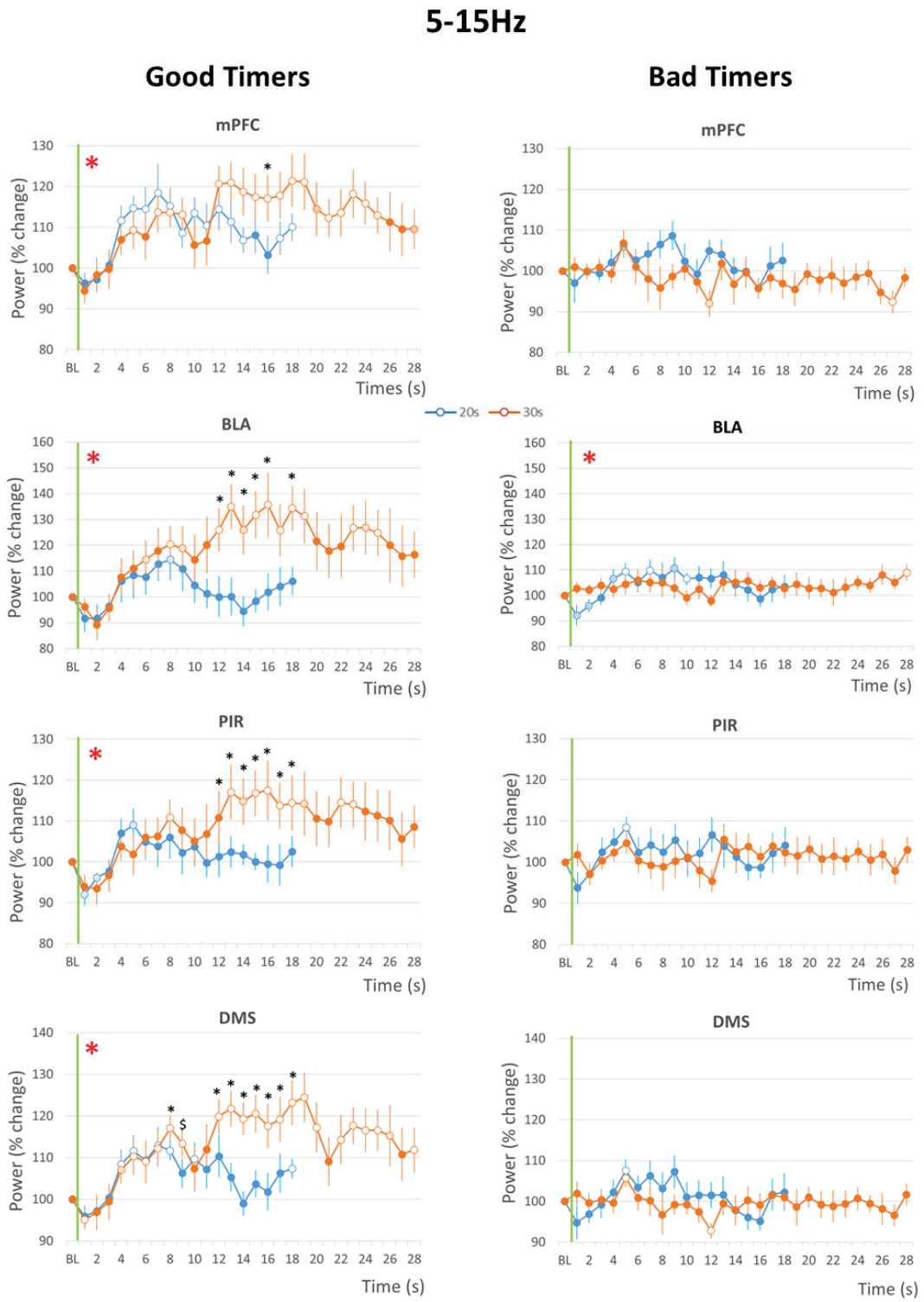


Figure 4: *Theta (5-15Hz) band mean power variations during the odor-shock interval in the Good Timers (left side) and Bad Timers (Right side) subgroups in the four recording sites. mPFC: medial prefrontal cortex; BLA: basolateral amygdala; PIR: olfactory piriform cortex; DMS : dorso-medial striatum. On each graph, theta power was expressed as percent change from the baseline (BL), and represented from odor onset (green vertical line) to shock arrival which occurs either at 20s (Training session 1, in blue) or at 30s (Training session 2, in orange). The red asterisk in the upper left corner of a graph signals a significant time x interval duration interaction. Open circles on each curve signal the values that are significantly different from the baseline ($p < 0.05$). Between curves difference *: $p < 0.05$.*

Figure 5: *Gamma (40-80Hz) band mean power variations during the odor-shock interval in the Good Timers (left side) and Bad Timers (Right side) subgroups in the four recording sites. mPFC: medial prefrontal cortex; BLA: basolateral amygdala; PIR: olfactory piriform cortex; DMS : dorso-medial striatum. On each graph, theta power was expressed as percent change from the baseline (BL), from the odor onset (green vertical line) to shock arrival which occurs either at 20s (Training session 1, in blue) or at 30s (Training session 2, in orange). The red asterisk in the upper left corner of a graph signals a significant time x interval duration interaction. Open circles on each curve signal the values that are significantly different from the baseline ($p < 0.05$). Between curves difference *: $p < 0.05$.*

Interval timing in Independ groups

In the previous experiment, the same animals received two training sessions, one with a 20s odor-shock interval, and the other one with a 30s interval. This allowed us to compare the temporal curves within the same rats, thus lowering inter-individual variability. However, the data obtained during the second training session might have been partly confounded by the first training. In order to assess this point, we compared the temporal curves obtained during the first training session of Group 20s to those of the single session of Group 30s. Thus, the only difference between the two groups was the duration of the odor-shock interval, but no more the level of training.

Figure 6A represents the temporal curves obtained for respiratory frequency in the two groups. The ANOVA revealed no significant effect of Group ($F_{1,13}$=0.48, p=0.50), but a significant effect of Time ($F_{17,221}$=5.66, p<0.0001) and a significant TimexGroup interaction ($F_{17,221}$=2.03, p=0.009). When the time axis for the 30s data was multiplicatively rescaled to assess scalar timing, the η^2 index increased from 0.58 (no rescaling) to 0.64 (multiplicative transform).

Figure 6B, upper left part, represents the temporal curves obtained for theta activity power in mPFC in the two groups. The ANOVA carried out in the four recording sites revealed no effect of Group, but a significant effect of Time in mPFC ($F_{17,221}$=2.35, p=0.002), and a significant TimexGroup interaction in mPFC ($F_{17,221}$=2.25, p=0.004), BLA ($F_{17,136}$=1.95, p=0.02) and DMS ($F_{17,221}$=1.95, p=0.02). When the time axis for the 30-s data was multiplicatively rescaled to assess scalar timing, η2 was greater under the multiplicative transform than under no rescaling in mPFC, BLA and DMS (Figure 6B, upper right part, and Figure 6-1).

Figure 6B, lower left part, represents the temporal curves obtained for gamma activity power in mPFC in the two groups. The ANOVA carried out in the four recording sites revealed no effect of Group, but a significant effect of Time in mPFC ($F_{17,221}$=4.18, p<0.0001), PIR ($F_{17,204}$=2.23, p=0.005) and DMS ($F_{17,221}$=3.59, p<0.0001), and a significant TimexGroup interaction in mPFC ($F_{17,221}$=3.30, p<0.0001) and DMS ($F_{17,221}$=2.24, p=0.004). When the time axis for the 30s data was multiplicatively rescaled to assess scalar timing, η2 was greater under the multiplicative transform than under no rescaling in mPFC and DMS (Figure 6B, lower right part, and Figure 6-2).

In summary, using two independent groups each trained with either 20s or 30s odor-shock interval duration, brought globally the same kind of data as those obtained using a single group trained with the two durations concerning the respiration and 5-15Hz temporal curves. Concerning 40-80Hz temporal curves, training in independent groups favored the expression of duration encoding in mPFC and DMS.

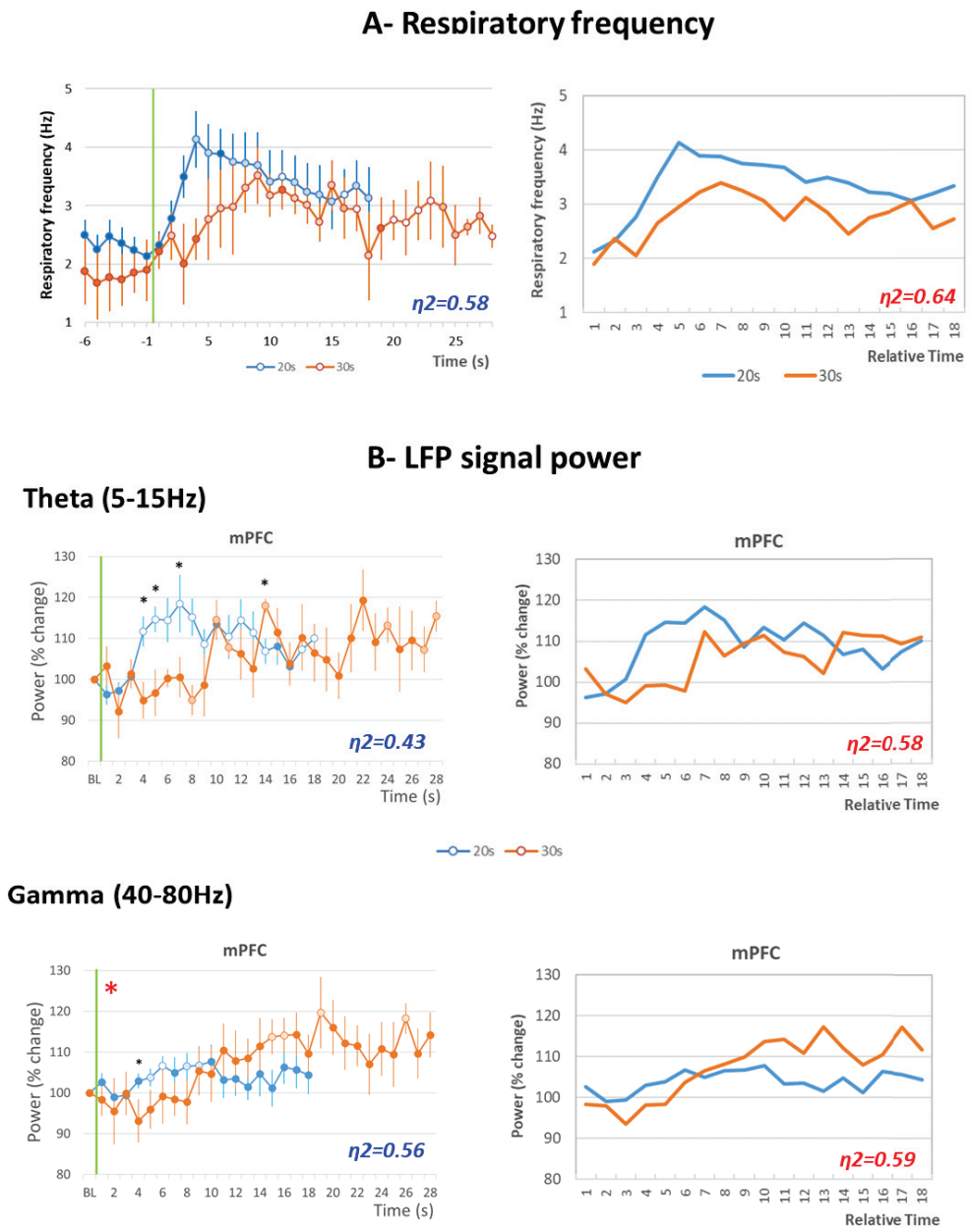


Figure 6: *Behavioral and electrophysiological in parallel training condition. A) Respiratory frequency curves. Left side, raw data: the temporal pattern of respiratory frequency is represented with a 1-s bin precision, from 5s before odor onset (green vertical line) to shock arrival which occurs either at 20s (Group 20s, in blue) or at 30s (Group 30s, in orange). Right side, rescaled curves: the time axis for the 30-s data (in orange) was multiplicatively rescaled. Superposition between the two curves was indexed by eta-square (η2) indicated in the bottom right of each graph, the highest values being highlighted in red. B) Local field potential (LFP) signal power in the mPFC (medial prefrontal cortex), in the theta (5-15Hz) and gamma (40-80Hz) bands. Left side, raw data: theta and gamma power was expressed as percent change from the baseline (BL), and represented from odor onset (green vertical line) to shock arrival which occurs either at 20s (Group 20s, in blue) or at 30s (Group 30s, in orange). Right side, rescaled curves. The red asterisk in the upper left corner of a graph signals a significant time x interval duration interaction. Open circles on each curve signal the values that are significantly different from the baseline (p < 0.05). Between curves difference *: p < 0.05. Superposition between the two curves was indexed by eta-square (η2) indicated in the bottom right of each graph, the highest values being highlighted in red.*

DISCUSSION

The present study is the first to investigate brain neural dynamics associated with interval timing in a pavlovian fear conditioning paradigm including only ten training trials. This was made possible thanks to the use of a sensitive behavioral index, namely respiration, which allowed getting a readout of the animal's interval timing ability without training the animal in a long and complex operant behavioral task. This gave us the opportunity to investigate the neural dynamics associated with the early stage of associative learning. Here we show that in animals exhibiting good timing abilities as assessed through respiration rate, temporal patterns of theta activity power related to interval timing are observed in the four recording sites, and those measured in mPFC and DMS respected the scalar property. In addition, temporal patterns of gamma activity are observed in mPFC, but not in the other sites.

Interval timing and level of stress

Here we show that respiratory rhythm can be used as a reliable index of interval timing providing that the level of stress of the animal is not too high. Indeed, we could distinguish two subgroups of animals based on their individual temporal pattern of respiratory frequency during the odor-shock interval, and its modification following the shift to a new interval duration. Good Timers presented temporal patterns that were modulated by the duration of the interval in a way that respected scalar property. In contrast Bad Timers showed similar temporal patterns for the two interval durations.

At the behavioral level, Bad Timers animals showed higher levels of freezing during the odor-shock interval, particularly during the second training session where the interval duration is increased from 20s to 30s. These animals also showed higher amounts of USV emission. These two parameters are known to narrow and lower the respiratory frequency range (Hegoburu et al, 2011; Frysztak and Neafsey, 1991; Dupin et al, 2019), which might have impeded the development of clear-cut temporal patterns.

In the present study, all the animals except two (out of 30) produced USV albeit at different rates. This is in contrast to what is usually observed in non-implanted animals, where the ratio of vocalizing animals is generally around 50% for the same foot-shock parameters (Hegoburu et al, 2011; Shionoya et al, 2013; Wöhr et al, 2005). The reason for this high rate of USV vocalizing animals in the present study might be related to their housing condition. Indeed, animals implanted with electrodes are housed individually. It has been shown that single housing increases anxiety and biological markers of stress as compared to social housing (Arakawa, 2018; Manouze et al, 2019) and the amount of USV emission is enhanced when the level of anxiety is increased (Wöhr et al, 2005). Indeed, more anxious rats (as assessed through the elevated plus maze) were shown to exhibit more freezing and to be more likely to vocalize than less anxious animals (Borta et al., 2006).

A few studies have addressed the impact of emotion on temporal behavior in animals. Among them, studies using a peak interval procedure (Brown et al., 2007; Meck and Macdonald, 2007) or a temporal bisection task (Faure et al, 2013; Kamada and Hata, 2019) showed that the presentation of a cue with a negative valence through its association with foot-shock,

produces a drastic disruption of the temporal behavior when intruded during the to-be-timed stimulus. In the present study, higher levels of stress in the Bad Timers subgroup might have induced the same effect on their temporal performances.

It might be argued that the absence of respiratory frequency temporal pattern in Bad Timers rats does not mean that these animals are not capable to time intervals, but rather that this ability cannot be assessed through respiratory rhythm. Using another index like for example heart rate, might have allowed detecting interval timing in these rats (Sananes and Campbell, 1989). However, as neural activity power in Bad Timers, akin to their respiration rate, was not modulated by interval duration, we feel confident that our classification based on respiratory patterns does indeed reflect the animal's timing ability.

Some authors have proposed that temporal relations between stimuli are automatically encoded, and are the foundation of associative learning (Balsam and Gallistel, 2009). Based on this assumption, it might be expected that animals with poor timing abilities should present lower learning performances than animals with good timing abilities. This is not what was observed in the present study since Bad Timers and Good Timers animals showed similar levels of learned odor fear during the 48h retention test. However, it would be interesting to analyze more in depth the strength of the fear memory in these animals by investigating for example if the memory is more resistant to extinction or persists longer in Good Timers than in Bad Timers.

Changes in theta and gamma activity power

Importantly, the temporal patterns of LFP signal power in the theta band were clearly different between Good Timers and Bad Timers subgroups suggesting that this subdivision initially based on respiration temporal patterns is also associated with differences in neural processes. In the Good Timers subgroup, the temporal patterns of theta activity power in the four recording sites were modulated by the duration of the odor-shock interval. In contrast, in the Bad Timers subgroup, theta activity power did not change compared to baseline during the odor-shock interval. Concerning activity in the gamma band, although signal power increased in Good Timers and Bad Timers during the interval, only temporal patterns in the mPFC in the Good Timers subgroup were modulated by the duration of the odor-shock interval. These data suggest that duration encoding in our paradigm might be supported by theta oscillatory activity in a wide network and gamma oscillatory activity in a more restricted network including the mPFC. In parallel, gamma activity might be involved in the encoding of the association.

These observations are in line with the data reported by Dallérac et al (2017). In this study, interval timing ability was assessed using a conditioned suppression paradigm, in which a learned aversive cue suppresses ongoing operant behavior consisting in lever pressing for food on a variable interval schedule of 30s on average. Aversive conditioning consisted of a tone paired with a mild electric footshock delivered 30s after tone onset. After several weeks of training, rats showed a bell-shaped curve of lever-pressing suppression, the maximum conditioned suppression being at a time close to the shock arrival. Furthermore, shifting the

tone-shock interval from 30s to 10s yielded a rapid shift in the peak of suppression. The authors examined oscillatory activity power in DMS and BLA and reported that the power of both theta and gamma oscillations increased during the tone with a maximum that shifted as a result of a change in tone-shock interval duration. Moreover, a significant increase in coherence between these structures was found in the low theta band (3–6 Hz). This led the authors to propose that learning of the association per se is modulated by the amygdalo-striatal projection through gamma oscillations while the timing component of the association would be driven by theta oscillations.

Does respiratory rhythm modulate the temporal patterns observed in theta band?

The temporal patterns obtained for respiratory frequency and for theta activity power present striking similarities, suggesting that changes in theta power follow changes in respiratory rate. Indeed the peak of theta power occurs when respiratory frequency peaks around 4 Hz, suggesting that respiratory rhythm in a specific range might entrain theta oscillatory activity.

Several recent studies in the literature have shown that the respiratory rhythm, in addition to its impact on olfactory regions (for a review, see Buonviso et al., 2006), also entrains oscillations in widespread brain regions including those involved in the fear network like the mPFC and amygdala (for a review, see Tort et al., 2018; Heck et al, 2017). This suggests that the breathing rhythm, akin to slow oscillatory rhythms, could help coordinate neural activity across distant brain regions (Jensen and Colgin, 2007; Heck et al., 2017), and potentially modulate cognitive processes. In the present study, we were not able to analyze the temporal pattern of activity in the 3-5 Hz delta band due to edge effects due to shock artefacts. However, others have found that a 4Hz oscillation develops in the mPFC during freezing behavior and that this oscillation was driven by respiration (Moberly et al, 2016; Karalis et al, 2016; Bagur and Benchenane, 2018). In line with these studies, we recently showed that respiratory frequency and delta activity frequency were highly correlated during freezing (Dupin et al, 2019). It could be hypothesized that the respiration-triggered 4Hz oscillation, when it occurs, is particularly well suited to modulate the amplitude of theta and higher frequency oscillations.

Importantly we previously reported that the emission of USV, that drastically lowers the respiratory rate down to 0.5-1.5Hz, disrupted the correlation between respiration and delta rhythm and was associated with a decrease in theta activity power (Dupin et al, 2019). This could explain why in Bad Timers animals, which present higher USV rates, theta activity power does not increase during the odor-shock interval.

Successive versus parallel training with different interval durations

In the present study, most of the animals were trained successively to the two interval durations. Such a paradigm allows comparing changes within animals, thus minimizing between animals differences, particularly concerning LFP signal power that can be very different between animals, due to differences in recording electrode tip position. However, the data obtained during the second training session might have been partly confounded by

the first training session. Indeed during the second session, the animals not only have to learn the new duration but also to forget the previous one. We therefore trained some animals in separate groups, using single training sessions with either 20s or 30s odor-shock interval duration. The data were similar to those obtained with successive training for respiration temporal patterns, allowing us to assume that these patterns are mostly linked to interval timing and not to training levels. Concerning oscillatory activity data, although both parallel and successive training led to temporal patterns modulated by interval duration, these patterns are slightly different between the two conditions. More specifically, in animals trained in successive sessions, temporal patterns of theta and gamma activity power for the 30s interval duration present an early increase similar to that observed for the 20s interval. This early increase was not present when animals are trained with a single 30s interval session. This difference is particularly visible in mPFC and DMS, suggesting that activity in these structures keeps a trace of previous interval duration.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and the LABEX CORTEX (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency.

We thank Marc Thevenet for technical assistance, and Ounsa Ben-Hellal for taking care of the animals.

Correspondence should be addressed to Maryne Dupin at maryne.dupin@inserm.fr or Anne-Marie Mouly at annemarie.mouly@cnrs.fr

REFERENCES

Arakawa H (2018) Ethological approach to social isolation effects in behavioral studies of laboratory rodents. Behavioural brain research 341:98-108.

Arcediano F, Escobar M, Miller RR (2003) Temporal integration and temporal backward associations in human and nonhuman subjects. Learning & behavior 31:242-256.

Bagur S, Lefort JM, Lacroix MM, de Lavilléon G, Herry C, Billand C, Geoffroy H, Benchenane K (2018) Dissociation of fear initiation and maintenance by breathing-driven prefrontal oscillations. bioRxiv 468264; doi: https://doi.org/10.1101/468264

Balsam PD, Gallistel CR (2009) Temporal maps and informativeness in associative learning. Trends in neurosciences 32:73-78.

Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Crouching as an index of fear. Journal of comparative and physiological psychology 67:370-375.

Borta A, Wohr M, Schwarting RK (2006) Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. Behavioural brain research 166:271-280.

Boulanger Bertolus J, Hegoburu C, Ahers JL, Londen E, Rousselot J, Szyba K, Thevenet M, Sullivan-Wilson TA, Doyere V, Sullivan RM, Mouly AM (2014) Infant rats can learn time

intervals before the maturation of the striatum: evidence from odor fear conditioning. Frontiers in behavioral neuroscience 8:176.

Brown BL, Hemmes NS, Cabeza de Vaca S (1997) Timing of th eCS-US interval by pigeons in trace and delay autoshaping. Q. J. Exp.Psychol.B 50, 40–53.

Brown BL, Richer P, Doyere V (2007) The effect of an intruded event on peak-interval timing in rats: isolation of a postcue effect. Behavioural processes 74:300-310.

Bueti D, Macaluso E (2010) Auditory temporal expectations modulate activity in visual cortex. NeuroImage 51:1168-1183.

Buhusi CV, Meck WH (2005) What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. Nature reviews Neuroscience 6:755-765.

Buonviso N, Amat C, Litaudon P (2006) Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. Chemical senses 31:145-154.

Coull JT, Cheng RK, Meck WH (2011) Neuroanatomical and neurochemical substrates of timing. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 36:3-25.

Dallerac G, Graupner M, Knippenberg J, Martinez RC, Tavares TF, Tallot L, El Massioui N, Verschueren A, Hohn S, Bertolus JB, Reyes A, LeDoux JE, Schafe GE, Diaz-Mataix L, Doyere V (2017) Updating temporal expectancy of an aversive event engages striatal plasticity under amygdala control. Nature communications 8:13920.

Davis M, Schlesinger LS, Sorenson CA (1989) Temporal specificity of fear conditioning: effects of different conditioned stimulus-unconditioned stimulus intervals on the fear-potentiated startle effect. Journal of experimental psychology Animal behavior processes 15:295-310.

Diaz-Mataix L, Tallot L, Doyere V (2014) The amygdala: a potential player in timing CS-US intervals. Behavioural processes 101:112-122.

Diaz-Mataix L, Ruiz Martinez RC, Schafe GE, LeDoux JE, Doyere V (2013) Detection of a temporal error triggers reconsolidation of amygdala-dependent memories. Current biology : CB 23:467-472.

Dupin M, Garcia S, Boulanger-Bertolus J, Buonviso N, Mouly AM (2019) New Insights from 22-kHz Ultrasonic Vocalizations to Characterize Fear Responses: Relationship with Respiration and Brain Oscillatory Dynamics. eNeuro 6.

Faure A, Es-Seddiqi M, Brown BL, Nguyen HP, Riess O, von Horsten S, Le Blanc P, Desvignes N, Bozon B, El Massioui N, Doyere V (2013) Modified impact of emotion on temporal discrimination in a transgenic rat model of Huntington disease. Frontiers in behavioral neuroscience 7:130.

Frysztak RJ, Neafsey EJ (1991) The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, "freezing," and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. Cerebral cortex 1:418-425.

Headley DB, Weinberger NM (2011) Gamma-band activation predicts both associative memory and cortical plasticity. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 31:12748-12758.

Heck DH, McAfee SS, Liu Y, Babajani-Feremi A, Rezaie R, Freeman WJ, Wheless JW, Papanicolaou AC, Ruszinko M, Sokolov Y, Kozma R (2016) Breathing as a Fundamental Rhythm of Brain Function. Frontiers in neural circuits 10:115.

Hegoburu C, Sevelinges Y, Thevenet M, Gervais R, Parrot S, Mouly AM (2009) Differential dynamics of amino acid release in the amygdala and olfactory cortex during odor fear acquisition as revealed with simultaneous high temporal resolution microdialysis. Learning & memory 16:687-697.

Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Mouly AM (2011) The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. Frontiers in behavioral neuroscience 5:25.

Jensen O, Colgin LL (2007) Cross-frequency coupling between neuronal oscillations. Trends in cognitive sciences 11:267-269.

Kamada T, Hata T (2019) Basolateral amygdala inactivation eliminates fear-induced underestimation of time in a temporal bisection task. Behavioural brain research 356:227-235.

Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J, Herry C (2016) 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. Nat Neurosci 19:605-612.

Kronland-Martinet R, Morlet J, Grossmann A (1987) Analysis of sound patterns through wavelet transforms. Int J Pattern Recog Art Intel 1:273-302.

Manouze H, Ghestem A, Poillerat V, Bennis M, Ba-M'hamed S, Benoliel JJ, Becker C, Bernard C (2019) Effects of Single Cage Housing on Stress, Cognitive, and Seizure Parameters in the Rat and Mouse Pilocarpine Models of Epilepsy. eNeuro 6.

Matell MS, Meck WH (2004) Cortico-striatal circuits and interval timing: coincidence detection of oscillatory processes. Brain research Cognitive brain research 21:139-170.

Meck WH, Macdonald CJ (2007) Amygdala inactivation reverses fear's ability to impair divided attention and make time stand still. Behavioral neuroscience 121:707-720.

Moberly AH, Schreck M, Bhattarai JP, Zweifel LS, Luo W, Ma M (2018) Olfactory inputs modulate respiration-related rhythmic activity in the prefrontal cortex and freezing behavior. Nat Commun 9:1528.

Parker KL, Chen KH, Kingyon JR, Cavanagh JF, Narayanan NS (2014) D1-dependent 4 Hz oscillations and ramping activity in rodent medial frontal cortex during interval timing. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 34:16774-16783.

Paxinos G, Watson C (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA: AcademicPress.

Popescu AT, Popa D, Pare D (2009) Coherent gamma oscillations couple the amygdala and striatum during learning. Nature neuroscience 12:801-807.

Roberts S (1981) Isolation of an internal clock. Journal of experimental psychology Animal behavior processes 7:242-268.

Roux SG, Garcia S, Bertrand B, Cenier T, Vigouroux M, Buonviso N, Litaudon P (2006) Respiratory cycle as time basis: an improved method for averaging olfactory neural events. Journal of neuroscience methods 152:173-178.

Sananes CB, Campbell BA (1989) Role of the central nucleus of the amygdala in olfactory heart rate conditioning. Behavioral neuroscience 103:519-525.

Shionoya K, Hegoburu C, Brown BL, Sullivan RM, Doyere V, Mouly AM (2013) It's time to fear! Interval timing in odor fear conditioning in rats. Frontiers in behavioral neuroscience 7:128.

Shuler MG, Bear MF (2006) Reward timing in the primary visual cortex. Science 311:1606-1609.

Tort ABL, Brankack J, Draguhn A (2018) Respiration-Entrained Brain Rhythms Are Global but Often Overlooked. Trends in neurosciences 41:186-197.

Wohr M, Borta A, Schwarting RK (2005) Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. Neurobiology of learning and memory 84:228-240.

Zelano C, Jiang H, Zhou G, Arora N, Schuele S, Rosenow J, Gottfried JA (2016) Nasal Respiration Entrains Human Limbic Oscillations and Modulates Cognitive Function. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 36:12448-12467.

EXTENDED DATA FIGURES

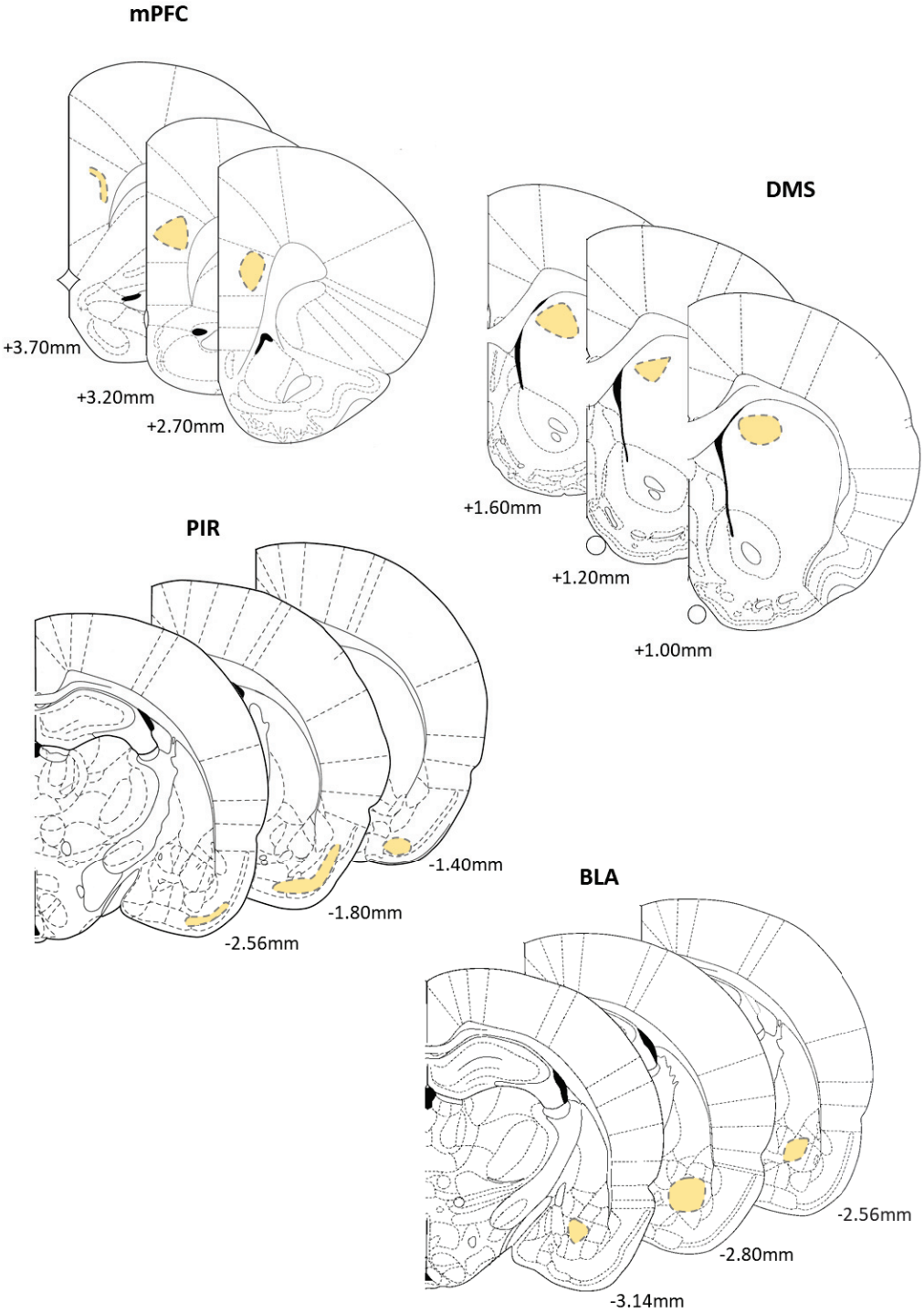


Figure 1-1

Figure 1-1: *Areas targeted by the electrodes (light orange areas) in the three recording sites. Numbers on the right indicate the relative position of coronal slices from bregma (Adapted from Paxinos and Watson, 2007). mPFC: medial prefrontal cortex; DMS : dorso-medial striatum; PIR: olfactory piriform cortex; BLA: basolateral amygdala.*

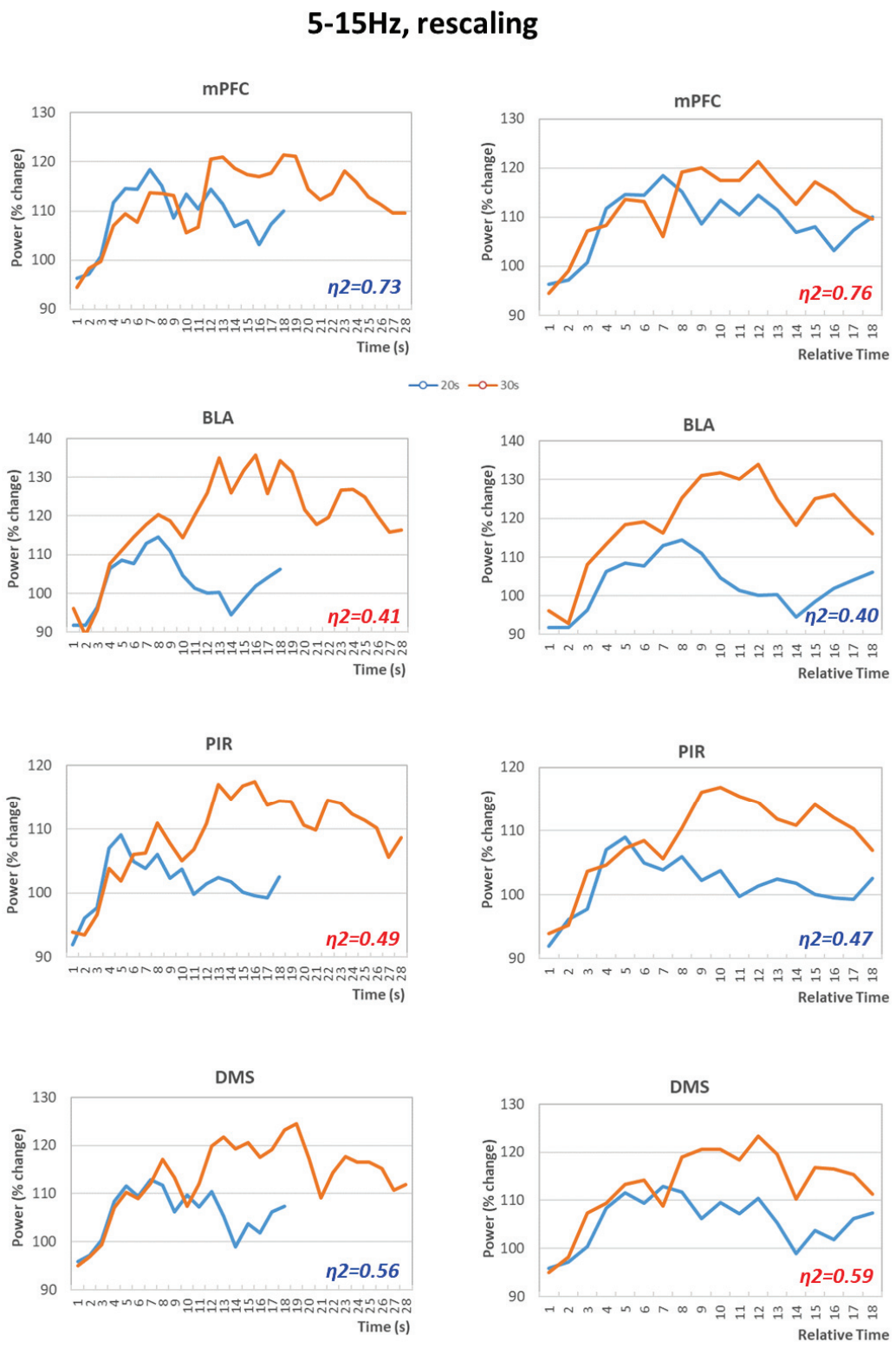


Figure 4-1: *Rescaling of theta (5-15Hz) band mean power variations during the odor-shock interval in the Good Timers subgroup in the four recording sites. mPFC: medial prefrontal cortex; BLA: basolateral amygdala; PIR: olfactory piriform cortex; DMS : dorso-medial striatum. Left side, raw data: theta power changes are represented from odor onset during the 20s (in blue) or the 30s (in orange) interval. Right side: rescaled curves: the time axis for the 30-s data (in orange) was multiplicatively rescaled. Superposition between the two curves was indexed by eta-square (η^2) indicated in the bottom right of each graph, the highest values being highlighted in red.*

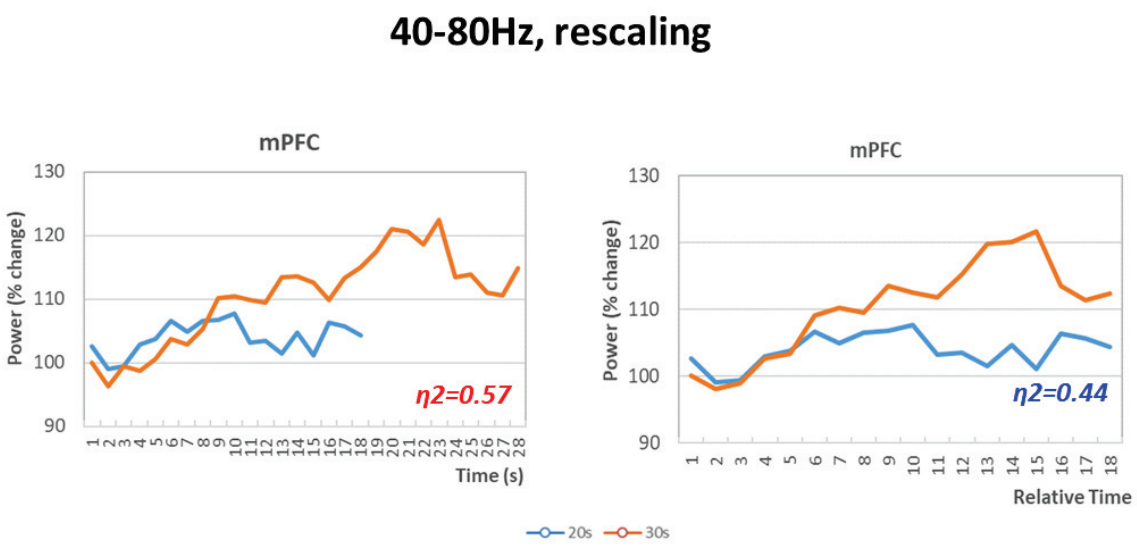


Figure 5-1*: Rescaling of gamma (5-15Hz) band mean power variations during the odor-shock interval in the Good Timers subgroup in the mPFC: medial prefrontal cortex. Left side, raw data: gamma power changes are represented from odor onset during the 20s (in blue) or the 30s (in orange) interval. Right side, rescaled curves: the time axis for the 30-s data (in orange) was multiplicatively rescaled. Superposition between the two curves was indexed by eta-square (η^2) indicated in the bottom right of each graph, the highest values being highlighted in red.*

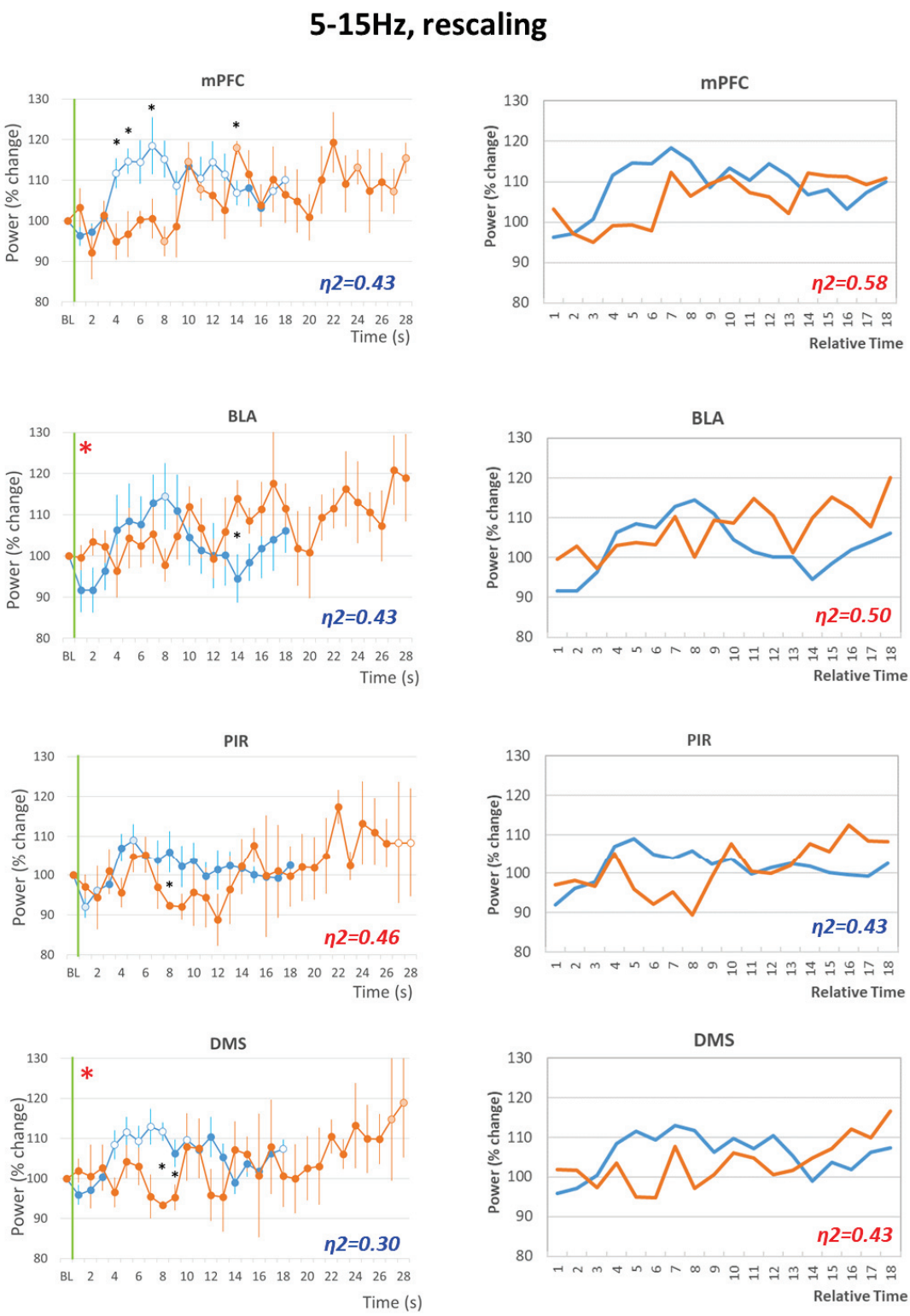


Figure 6-1: *Theta (5-15Hz) band mean power variations in Group 20s and Group 30s, during the odor-shock interval in the four recording sites. mPFC: medial prefrontal cortex; BLA: basolateral amygdala; PIR: olfactory piriform cortex; DMS : dorso-medial striatum. Left side, raw data: theta power changes are represented from odor onset (green vertical line) during the 20s (in blue) or the 30s (in orange) interval. Right side: rescaled curves: the time axis for the 30-s data (in orange) was multiplicatively rescaled. Superposition between the two curves was indexed by eta-square (η^2) indicated in the bottom right of each graph, the highest values being highlighted in red.*

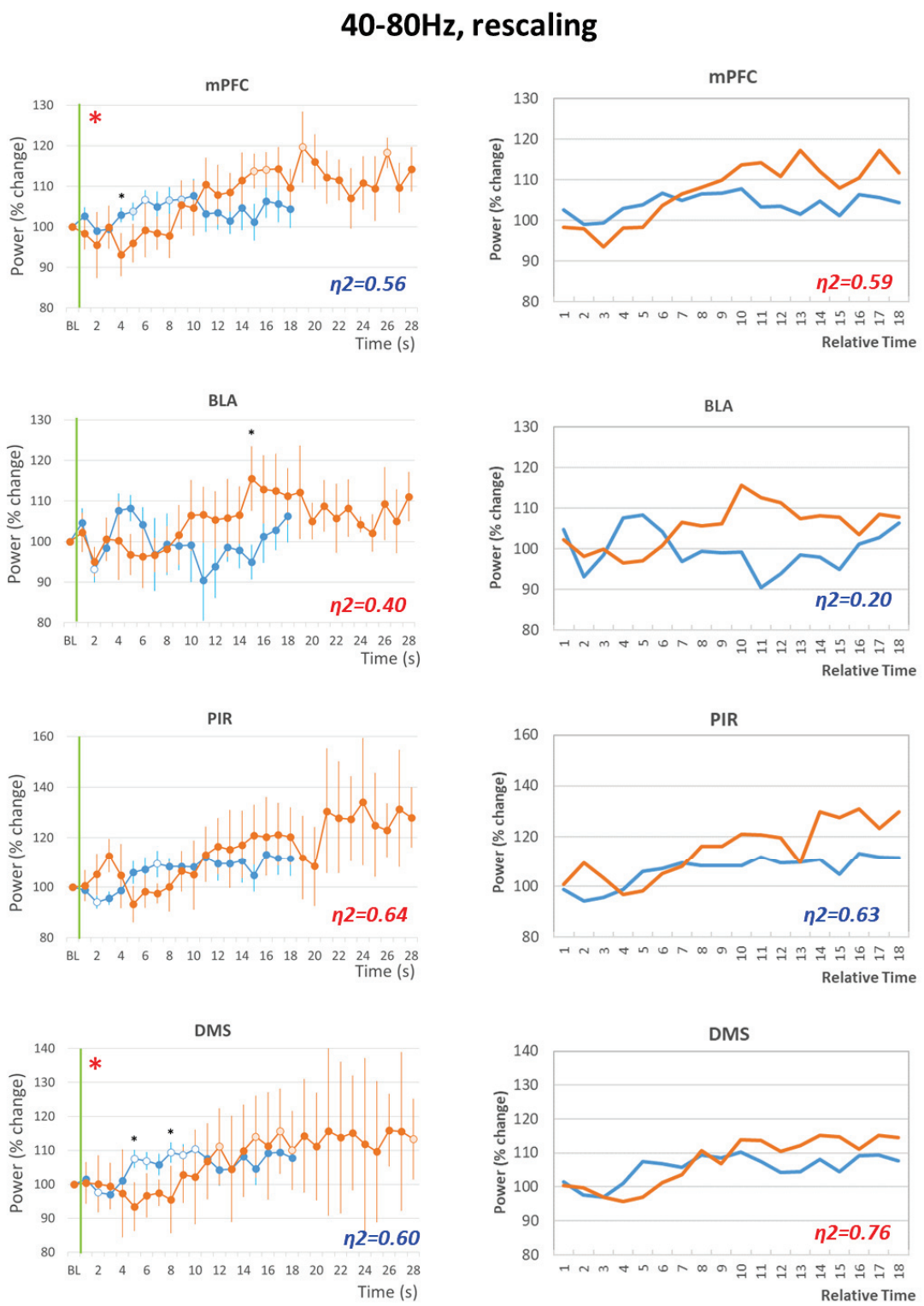


Figure 6-2: *Gamma (40-80Hz) band mean power variations in Group 20s and Group 30s, during the odor-shock interval in the four recording sites. mPFC: medial prefrontal cortex; BLA: basolateral amygdala; PIR: olfactory piriform cortex; DMS : dorso-medial striatum. Left side, raw data: gamma power changes are represented from odor onset (green vertical line) during the 20s (in blue) or the 30s (in orange) interval. Right side: rescaled curves: the time axis for the 30-s data (in orange) was multiplicatively rescaled. Superposition between the two curves was indexed by eta-square (η^2) indicated in the bottom right of each graph, the highest values being highlighted in red.*

Discussion générale et perspectives

En enregistrant les LFP pendant un conditionnement de peur pavlovien à l'odeur en parallèle du comportement et de la respiration chez des rats adultes, nous avons pu observer les corrélats neuronaux de l'expression des réponses de peur, notamment les USV, et de l'encodage du temps dans le réseau de structures incluant l'amygdale, le cortex préfrontal médian, le striatum dorsal et le cortex piriforme. Nous allons maintenant revenir sur quelques points de réflexions que nous n'avons pas abordés dans la discussion de nos deux études.

I. La respiration est-elle le seul indice de la mémoire temporelle ? *(étude 2)*

Dans la deuxième étude, nous avons mesuré les USV, le freezing et la respiration tout au long du conditionnement dans le but d'augmenter la finesse de la mesure comportementale. Nous avons ensuite privilégié l'utilisation de la respiration comme indice de l'estimation temporelle. Nous allons revenir sur les raisons de ce choix.

1. Les USV

Les USV sont un bon paramètre de mesure de l'état émotionnel de l'animal (voir introduction de l'étude 1). Une étude réalisée dans l'équipe a montré que si ces USV reflètent bien l'apprentissage de l'association odeur-choc dans le conditionnement de peur à l'odeur, ils ne semblent à priori par être un bon indice de l'encodage du temps. En effet, ces USV disparaissent immédiatement à l'arrivée de l'odeur, et réapparaissent avant l'arrivée du choc (Shionoya et al., 2013). Néanmoins, à l'inverse de la fréquence respiratoire, leur décours temporel pendant l'intervalle n'est pas modifié par la durée de l'intervalle et ne respecte pas la propriété scalaire. Nous avons obtenu le même résultat dans notre étude 2 ainsi qu'illustré sur la Figure 46, confirmant ainsi que les USV ne sont pas un bon indice pour mesurer la mémoire temporelle.

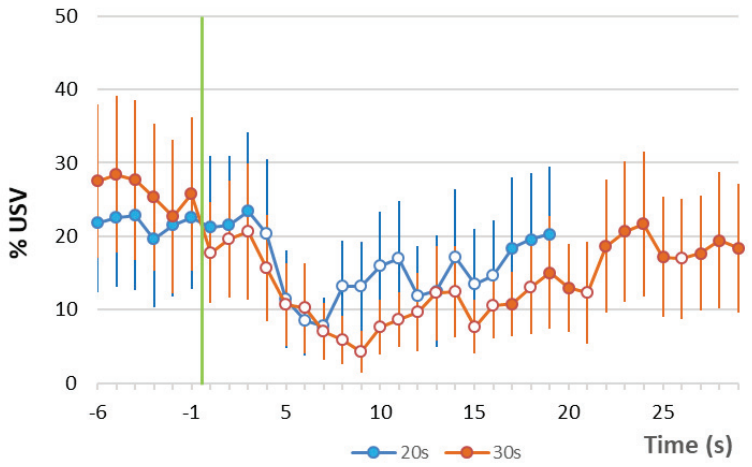


Figure 46 : *Décours temporel des USV au cours deux intervalles de temps différents. En bleu le conditionnement avec un intervalle odeur-choc de 20s, en orange de 30s. La ligne verte indique l'arrivée de l'odeur. L'ANOVA ne révèle pas d'interaction significative entre la durée de l'intervalle et le temps.*

2. Le freezing

Le freezing est la mesure classiquement utilisée dans la littérature pour quantifier la réponse de peur de l'animal et la force de l'apprentissage de l'association. Cette mesure manque cependant de finesse temporelle. En effet lorsque la réponse de freezing est déclenchée suite à l'arrivée du stimulus aversif, elle persiste souvent tout au long de la séance sans être modulée de façon significative. Nous avons mesuré le décours temporel de la réponse de freezing pendant l'intervalle odeur-choc dans notre protocole et nous avons observé que si le niveau de freezing reste stable pendant l'intervalle de 20s, il a tendance à décroitre avant l'arrivée du choc pour un intervalle de 30s (Figure 47). L'analyse statistique montre par ailleurs une interaction significative entre la durée de l'intervalle et le temps, comme observé pour la respiration. Cela confirme ce que Shionoya et al (2013) avait déjà observé et suggère que si l'intervalle est suffisamment long, la réponse de freezing pourrait présenter un décours temporel en lien avec la durée de l'intervalle. Cet indice pourrait donc être utilisé en complément de l'indice respiratoire lorsque les intervalles ont une certaine durée.

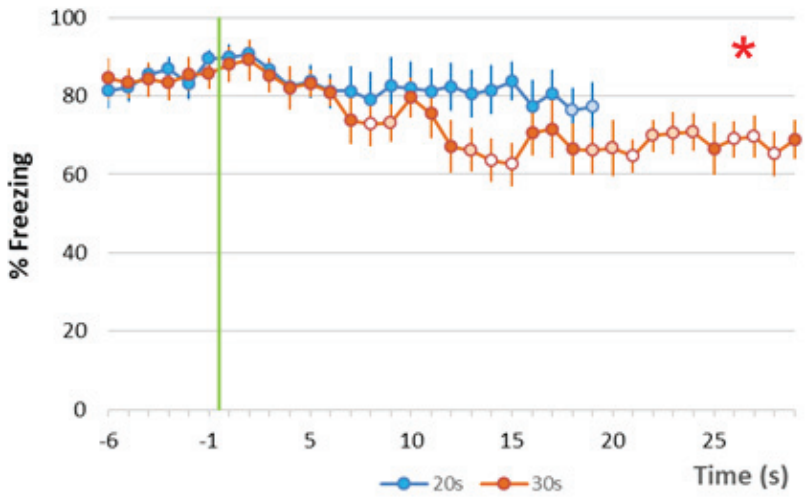


Figure 47 : *Décours temporel de la réponse de freezing au cours de deux intervalles de temps différents. En bleu le conditionnement avec un intervalle odeur-choc de 20s, en orange de 30s. La ligne verte indique l'arrivée de l'odeur. L'étoile rouge signale une interaction significative entre la durée de l'intervalle et le temps (p<0.05).*

3. La respiration : un indice de mémoire temporelle quelle que soit la modalité sensorielle ?

Dans notre paradigme expérimental de conditionnement de peur à l'odeur, le meilleur indice d'encodage du temps est la respiration. Or ainsi que nous l'avons vu dans l'introduction (Chapitre 2), olfaction et respiration sont étroitement liées puisque l'échantillonnage du stimulus olfactif se fait via l'inspiration et induit chez le rongeur, une forte augmentation du rythme respiratoire qui favorise l'arrivée des molécules odorantes sur la muqueuse olfactive.

La respiration est également modulée par l'état émotionnel de l'animal (Homma et Masaoka, 2008; Boiten, 1998; Ley, 1999; Hegoburu et al., 2011). En utilisant un stimulus olfactif, nous nous plaçons donc dans des conditions optimales pour voir des variations du rythme respiratoire et faciliter ainsi la détection d'un pattern temporel. On pourrait donc penser que cet indice d'encodage du temps est spécifique à la modalité olfactive.

Nous avons donc posé cette question dans une expérience préliminaire réalisée au début de ma thèse/master, en étudiant le décours temporel du rythme respiratoire dans un conditionnement de peur au son (7kHz). Nous avons regardé si la courbe temporelle de la fréquence respiratoire en réponse à un son était semblable à celle observée pour une odeur. L'arrivée du son induit bien une augmentation de la fréquence respiratoire, mais elle est plus faible et plus précoce que pour une odeur. La différence d'amplitude est liée à la nature du stimulus : le stimulus sonore n'est pas échantillonné par la respiration, mais son arrivée induit une réponse d'éveil qui induit une petite augmentation de la fréquence respiratoire. La différence de latence de la réponse respiratoire est liée à la différence de latence d'arrivée des deux types de stimuli : immédiate pour le son, 3-4s de diffusion dans les tubes de l'olfactomètre pour l'odeur dans notre dispositif expérimental. Si l'on compare les deux patterns temporels (Figure 48), on voit que le décours temporel de la respiration peut être scindé en deux parties, la première partie propre à la modalité sensorielle du stimulus utilisé et à son échantillonnage, alors que la deuxième est commune aux deux types de stimulus et est le reflet de l'anticipation du choc.

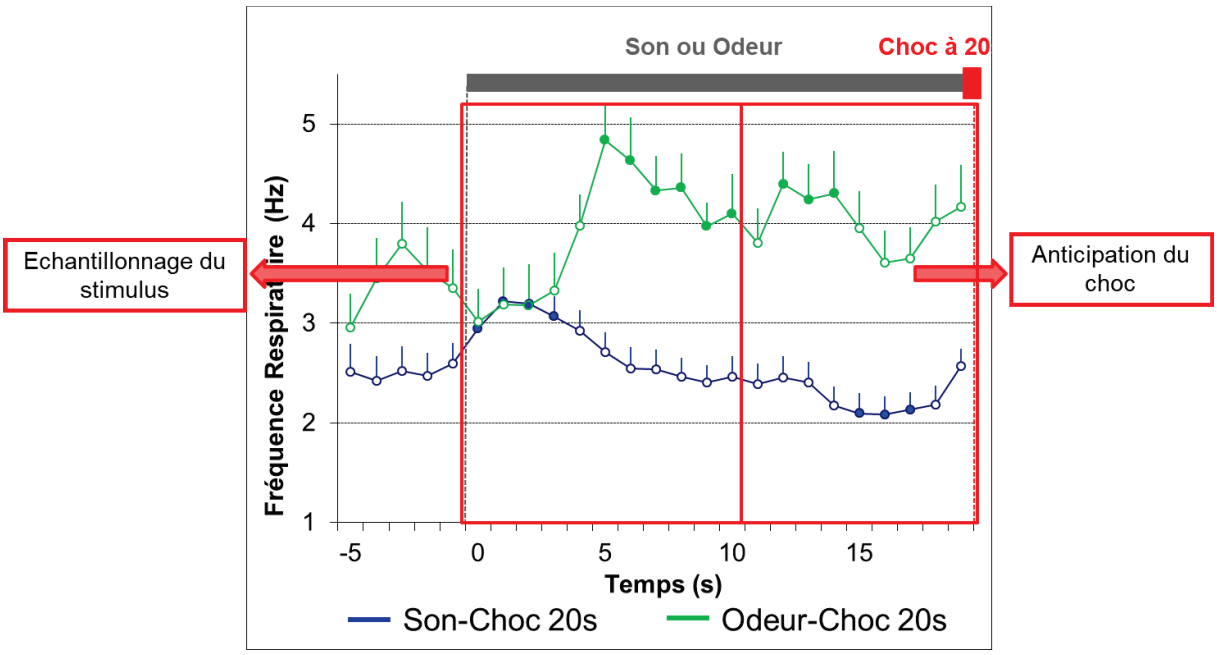


Figure 48 : *Décours temporel de la fréquence respiratoire au cours d'un intervalle de 20s pour des stimuli différents. En plus, un stimulus auditif est associé au choc, en vert, c'est un stimulus olfactif qui est associé au choc. Deux parties se distinguent : une première propre à la modalité sensorielle du stimulus utilisé et liée à son échantillonage ; une deuxième commune aux deux types de stimulus qui serait le reflet de l'anticipation du choc.*

La respiration pourrait donc être un bon indice de l'encodage du temps également dans le cas d'un stimulus non olfactif. Il serait cependant intéressant d'enregistrer d'autres paramètres comme le rythme cardiaque ou la pression sanguine pour établir un multi index de classement des animaux. Ces paramètres pourraient également être des bons indices d'encodage du temps car ils présentent les mêmes avantages que la respiration (réponse émotionnelle, subtilité et immédiateté des variations, …).

4. Les limites de l'utilisation de la respiration comme indice d'encodage du temps

Même si la respiration présente un très bon indice de l'encodage du temps, quelques limites peuvent être relevées. Ces limites sont essentiellement à imputer à la durée de l'intervalle à encoder. En effet, on peut penser que si la durée de l'intervalle est trop courte, le pattern temporel de la respiration n'a pas l'opportunité de se mettre en place puisque les 5 premières secondes au moins sont consacrées à l'échantillonnage du stimulus olfactif et impactent le décours temporel de la respiration. De ce fait, il devient problématique d'étudier des durées d'intervalles odeur-choc de l'ordre de 10s par exemple. Par ailleurs, la fréquence respiratoire varie dans une gamme restreinte de valeurs (1.5 à 9Hz environ) limitant ainsi la gamme de variation possible. Un exemple de cette limite a été rencontré dans l'étude 2, où nous avons vu que lorsque les animaux étaient trop stressés, leur fréquence respiratoire était plus basse et ne permettait pas d'observer de pattern temporel lié à la durée de l'intervalle.

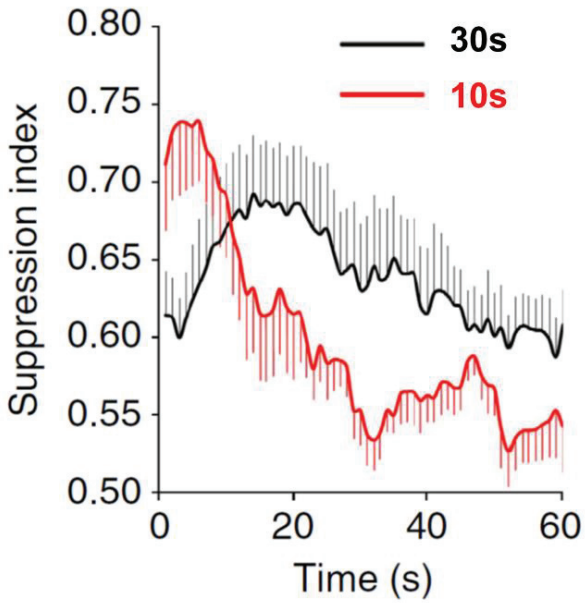


Figure 49 : *Evolution de l'indice de suppression conditionné (±sem) selon la durée de l'intervalle. En noir, l'intervalle son-choc de 30s, en rouge celui de 10s. Le pattern des courbes comportementales permet d'estimer la durée de l'intervalle qui a été encodé (Dallérac et al., 2017).*

Une autre limite de l'utilisation de la respiration comme indice temporel est que cette mesure ne permet pas d'accéder à l'estimation temporelle faite par l'animal : en effet, dans les tâches temporelles classiques comme la tâche de PI, on introduit des essais non renforcés et la courbe du nombre d'appuis sur levier obtenue pendant ces essais présente un pic au temps où l'animal attend la récompense (Figure 49). La largeur du pic permet d'évaluer la précision avec laquelle l'animal estime la durée, et le pattern de la courbe suit la propriété scalaire (Matell et Meck, 2000). La courbe temporelle de la respiration n'est pas directement comparable à ce type de courbe et ne permet pas de déduire précisément l'estimation temporelle faite par l'animal. Rappelons que les tâches temporelles classique basées sur l'appui sur levier nécessitent de très nombreuses séance d'apprentissage et ne peuvent donc pas être utilisées pour étudier l'encodage du temps en début d'apprentissage associatif. Si l'on veut aborder cette question, il faut donc trouver un indice de l'encodage du temps valable pour une tâche qui est acquise en très peu d'essais.

II. Mémoire temporelle et mémoire de l'association *(étude 2)*

L'étude 2 a montré que l'on observait des modulations d'activités oscillatoires liées à l'encodage du temps dans les structures qui sont classiquement impliquées dans le conditionnement de peur à l'odeur, telles que l'amygdale, le cortex préfrontal et le cortex piriforme. Ceci serait en faveur de l'hypothèse de Balsam et al. (2010) qui suggère que la mémoire temporelle serait à la base même de l'apprentissage associatif. Plus précisément, l'apprentissage des relations temporelles entre les évènements se ferait de façon automatique et déterminerait la vitesse d'émergence, la vigueur et la forme des réponses de peur. Cette idée se retrouve dans certaines pathologies. Par exemple, dans la maladie de Huntington, Righi et al. (2016) ont montré que des déficits d'encodage du temps étaient associés à des déficits mnésiques.

Nous avons abordé cette question de façon indirecte dans l'étude 2 puisque nous avons pu distinguer deux groupes d'animaux différents : les bons et les mauvais timers. Contrairement à ce qui était attendu par rapport à l'hypothèse de Balsam, nous n'avons pas observé d'altération dans l'apprentissage de l'association chez les mauvais timers par rapport aux bons timers. En effet, lorsque l'on présente l'odeur seule 48 heures après le conditionnement, les deux groupes montrent des niveaux de freezing équivalents, suggérant une force de l'apprentissage équivalente.

Comment peut-on expliquer ceci ? Rappelons que nos deux groupes de rats ont été définis par rapport au décours temporel de la respiration au cours de l'intervalle à encoder. On pourrait nous objecter que l'absence de pattern temporel de la respiration chez les mauvais timers n'implique pas forcément que ces animaux ne sont pas capables d'encoder le temps, mais plutôt que sur ces animaux qui présentent un niveau de stress plus élevé que les bons

timers, la respiration n'est pas le bon indice à utiliser. Cependant, les données électrophysiologiques des mauvais timers montrent, comme les données respiratoires, que le pattern des activités oscillatoires ne présente pas de corrélats d'encodage du temps. Nous sommes donc confiants sur le fait que la distinction bon vs mauvais timer basée sur le signal respiratoire est bien le reflet des capacités d'encodage du temps des animaux.

Pour évaluer la force de l'apprentissage dans les deux sous-groupes, nous avons quantifié la réponse de freezing à l'odeur lors d'un test de rétention à 48h. Les deux groupes de rats présentent des pourcentages de freezing équivalent (Figure 3A de la publication 2). Il est possible que cette mesure de freezing ne soit pas assez fine pour détecter des différences dans la performance des animaux. Par ailleurs, une autre façon de mesurer la force d'un apprentissage est de regarder sa résistance à l'extinction et/ou son maintien à long-terme. Dans cette optique, dans les deux sous-groupes d'animaux, nous avons acquis des données de rappel à long terme qu'il nous reste à analyser, et qui nous servirons à creuser la question du lien entre mémoire temporelle et mémoire de l'association.

III. Lien entre les deux études : Rôle de l'émission des USV dans l'étude 2 ? *(études 1 et 2)*

Dans notre première étude, nous avons montré que l'émission des USV avait un fort impact sur les activités oscillatoires dans le même réseau de structures que celui enregistré dans l'étude 2. Nous avons vu dans un premier temps que l'émission d'USV induit une diminution de puissance dans la bande theta, et une augmentation dans les bandes delta et gamma. De plus nous avons mis en évidences des effets liés au changement de rhythme respiratoire. Ainsi, lorsque l'animal est en freezing, en l'absence d'USV, on observe une synchronisation entre le rythme respiratoire (qui est autour de 2-4Hz) et l'activité oscillatoire cérébrale lente dans la bande delta (0-5Hz). L'émission d'USV contraint fortement le rythme respiratoire à osciller dans une gamme de fréquence très restreinte (1.5-0.5-1.5Hz). En parallèle, on observe une désynchronisation entre le rythme respiratoire et l'activité dans la bande delta. L'organisation des oscillations rapides gamma par rapport au rythme respiratoire est également modifiée.

L'ensemble de ces données montre que l'émission des USV a un impact à la fois sur la respiration et les rythmes cérébraux, deux facteurs qui servent de base à notre deuxième étude. Il est donc possible que bien que les USV ne soient pas un bon indice de l'encodage du temps, ils participent aux effets observés sur les activités oscillatoires pendant l'intervalle odeur-choc. En effet, lors des périodes inter-essais (entre chaque association odeur-choc), les rats émettent des USV de façon régulière. A l'arrivée de l'odeur, les rats stoppent l'émission de ces USV et échantillonnent l'odeur. Après une quinzaine de secondes, l'émission des USV reprend jusqu'à l'arrivée du choc. On peut supposer par exemple qu'à l'arrivée du stimulus, l'arrêt de la production des USV est obligatoire pour que le rat puisse augmenter sa fréquence respiratoire et donc flairer l'odeur. De plus, cela permet également aux activités oscillatoires

de se resynchroniser avec la respiration, et particulièrement aux oscillateurs corticaux de se synchroniser entre eux au début de l'intervalle à encoder dans un modèle de type SBF. La reprise des USV qui se fait quelques temps avant l'émission du choc pourrait induire des changements dans les activités oscillatoires qui se superposeraient à ceux liés plus spécifiquement à l'encodage du temps, et rajouteraient de ce fait une certaine forme de modulation temporelle. Un fait intéressant dans l'étude 2 est que les mauvais timers présentent un niveau d'activité dans la bande theta plus faible que celui des bons timers. Or ces animaux émettent plus d'USV que les bons timers et nous avons vu dans l'étude 1 que l'émission d'USV induisait une diminution de l'activité dans la bande theta.

IV. Analyses restant à faire et perspectives *(études 1 et 2)*

1. Analyse des activités oscillatoires

Jusqu'à présent dans les deux études, nous avons mesuré les variations de puissance dans les différentes bandes d'activité étudiées, et dans l'étude 1, nous avons abordé la question de la synchronisation des différentes activités avec le rythme respiratoire.

• Analyse de cohérence

Dans les deux études, l'analyse de la cohérence dans une bande d'activité oscillatoire donnée, entre deux structures au sein du réseau permettrait d'inférer l'existence d'un couplage fonctionnel entre ces structures. Par exemple dans l'étude 2, il serait intéressant de voir s'il y a des changements de cohérence entre certaines structures au cours de l'intervalle à encoder. Dans le modèle SBF, au début d'un intervalle à mesurer, il y aurait un signal dopaminergique qui synchroniserait la phase des oscillateurs corticaux. On pourrait penser que ceci s'accompagne d'augmentation de la cohérence au sein du réseau, notamment au début de cet intervalle, ou encore à la fin de celui-ci. Récemment Dallérac et al (2017) ont montré que la cohérence entre le striatum dorsal et l'amygdale dans la bande 3-6Hz augmente pendant l'intervalle à encoder, et que le pic de cohérence se produit au temps où le stimulus inconditionnel est attendu. Les auteurs en concluent que le couplage fonctionnel entre ces deux structures est l'un des corrélats neuronaux de l'encodage des durées.

• La respiration comme synchronisateur

Comme nous l'avons vu au chapitre 3 de l'introduction générale, un nombre important de travaux récents de la littérature montrent que le rhythme respiratoire peut entraîner non seulement les rythmes lents cérébraux mais également les rythmes rapides (pour revues voir Tort et al, 2018b; Heck et al, 2017). Dans notre première étude, nous avons constaté que les rythmes cérébraux et la respiration étaient syncrhonisés lors des périodes de freezing. On peut alors envisager que la respiration pourrait participer à la synchronisation des oscillateurs corticaux au début de l'intervalle à encoder dans un modèle de type SBF. Si l'on va plus loin dans cette hypothèse, on peut envisager la respiration comme un fil guide tout au long de

l'intervalle à encoder, qui permettrait à des moments cruciaux de synchroniser à la fois les activités oscillatoires lentes mais également rapides entre les structures. Il serait donc intéressant de réaliser sur nos données des mesures de couplage phase-amplitude (PAC : Phase Amplitude Coupling ; Tort et al, 2010). Par exemple dans l'étude 2, nous avons observé que le pic de puissance dans la bande theta se produisait au moment où la fréquence respiratoire était entre 3 et 4Hz (Figure 50). Il serait intéressant de rechercher si l'amplitude du signal dans la bande theta est modulée par la phase du rythme respiratoire lorsqu'il atteint cette fréquence de 3-4Hz.

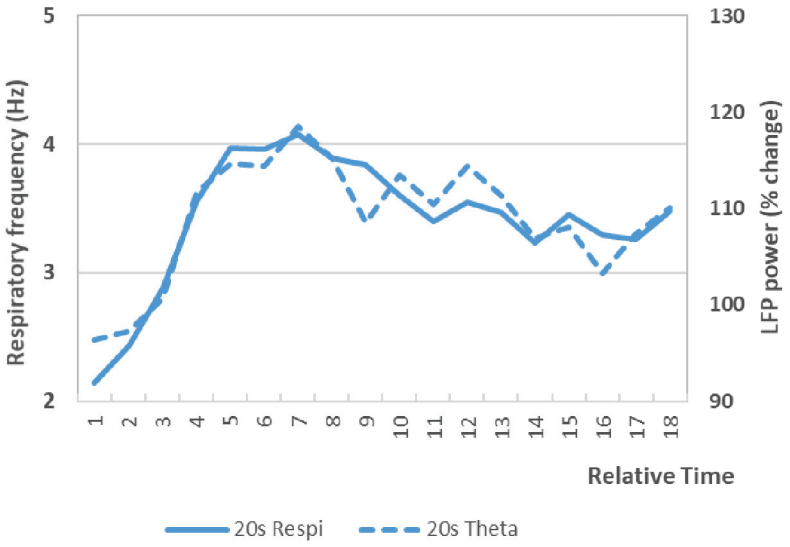


Figure 50 : *Superposition du décours temporel de la respiration et de la puissance dans la bande fréquence thêta au cours de l'intervalle odeur-choc de 30s.*

2. Inhibition de voies de projections dans le réseau

Les résultats que nous avons obtenus dans nos deux études nous permettent d'établir des corrélations entre des variations de puissance dans certaines bandes de fréquence au sein du réseau étudié et certains comportements (émission d'USV ; comportement temporel), et de faire des hypothèses sur le rôle des structures dans les comportements mesurés. Mais dans les deux cas, le lien causal n'est pas démontré. Pour cela, on peut recourir à l'inhibition de structures ou de voies de projections au sein du réseau. Ces inhibitions peuvent être réalisées par différentes méthodes, notamment par pharmacogénétique (technique DREADD), ou encore l'optogénétique. Nous avions envisagé d'utiliser cette approche dans l'étude 2.

Bien qu'un ensemble de structures, et donc de voies de projections, semblent impliquées dans les processus d'encodage du temps, des données récentes suggèrent l'implication d'une voie en particulier : la voie de projection du noyau basal de l'amygdale sur le striatum dorsomédian. En effet, Dallérac et al. (2017) ont montré que ce réseau amygdalo-striatal sous tendait l'apprentissage d'un intervalle entre un stimulus conditionnel et inconditionnel. Ils ont

observé des changements de cohérence en thêta (3-6Hz) entre ces structures au cours de l'intervalle. Ils ont également montré que lorsque la durée de l'intervalle de temps à encoder était modifiée, cela engendrait des modifications à long terme de l'efficacité synaptique de la voie de projection cortico-striatale qui étaient sous le contrôle de l'amygdale.

Dans l'étude 2, nous avions donc pour objectif au cours de la thèse de tester l'implication de cette voie dans les processus de codage temporel en l'inactivant sélectivement par pharmacogénétique grâce à l'injection combinée de deux virus (Figure 51) : une injection dans l'amygdale d'un virus contenant le récepteur inhibiteur DREADD (hM4D-Gi) dont l'expression est dépendante de la Cre-recombinase ; et une injection dans le striatum d'un virus rétrograde contenant la Crerecombinase. Ces micro-injections sont réalisées trois semaines avant le conditionnement de peur à l'odeur. Puis, juste avant le conditionnement, l'injection par voie intrapéritonéale d'un ligand exogène du DREADD (la clozapine), permet l'activation du DREADD, ce qui induit l'inhibition sélective des neurones de l'amygdale se projetant sur le striatum.

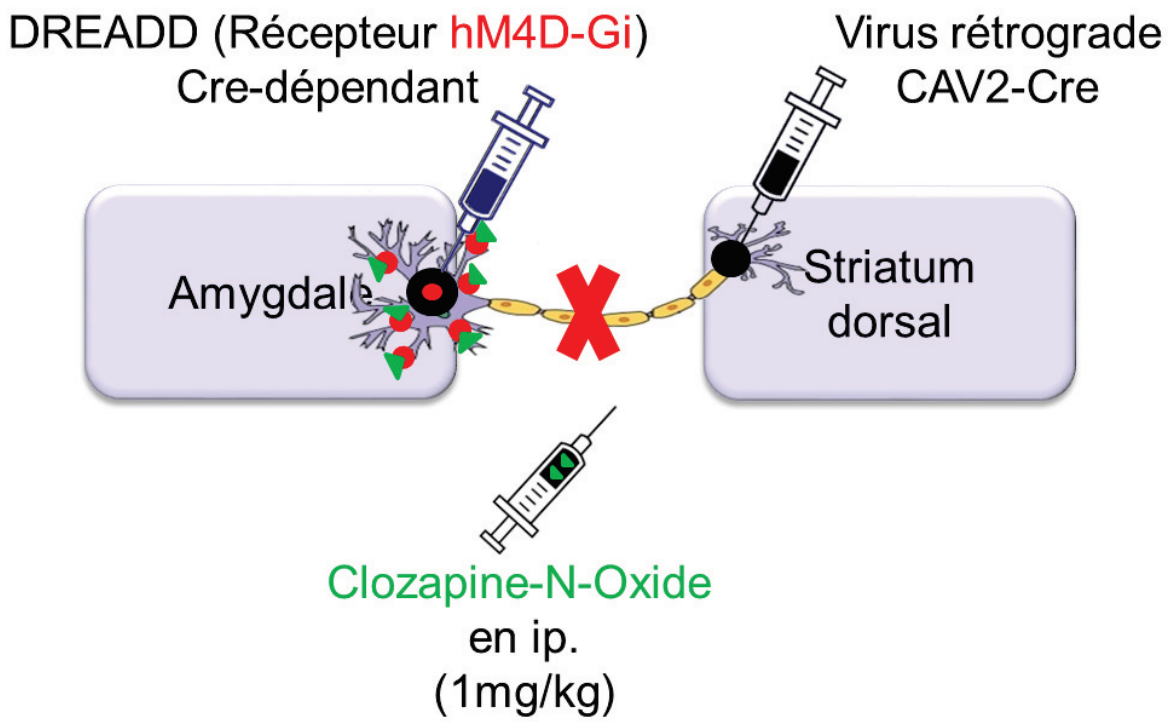


Figure 51 : *Schéma explicatif de la technique pharmacogénétique DREADD.*

Nous faisions l'hypothèse que l'inhibition de cette voie pendant la séance d'acquisition du conditionnement de peur à l'odeur devrait altérer plus spécifiquement l'encodage du temps dans cet apprentissage, ce qui serait visible au niveau du pattern temporel de la réponse respiratoire et des activités oscillatoires dans le réseau.

Nous avons commencé à mettre au point ces injections en collaboration avec Jeanne Chantre, une stagiaire de la filière Biochimie et Biotechnologies de l'INSA. Les coordonnées stéréotaxiques des sites d'injections, le volume et la concentration des virus ont été ajustés et sont désormais utilisables ; l'expression des virus de manière sélective est confirmée.
En parallèle, nous avons testé l'influence du CNO sur le conditionnement de peur. Nos résultats suggèrent que l'injection de CNO à une concentration de 1mg/kg n'a pas d'impact sur l'apprentissage de peur à l'odeur, les performances des animaux injectés avec du CNO étant identiques à celles d'animaux contrôles, lors du test de rétention à 24h (Figure 52). Nous n'avons pas poursuivi à l'heure actuelle cette étude par manque de temps, mais les résultats de mise en place du protocole sont encourageants.

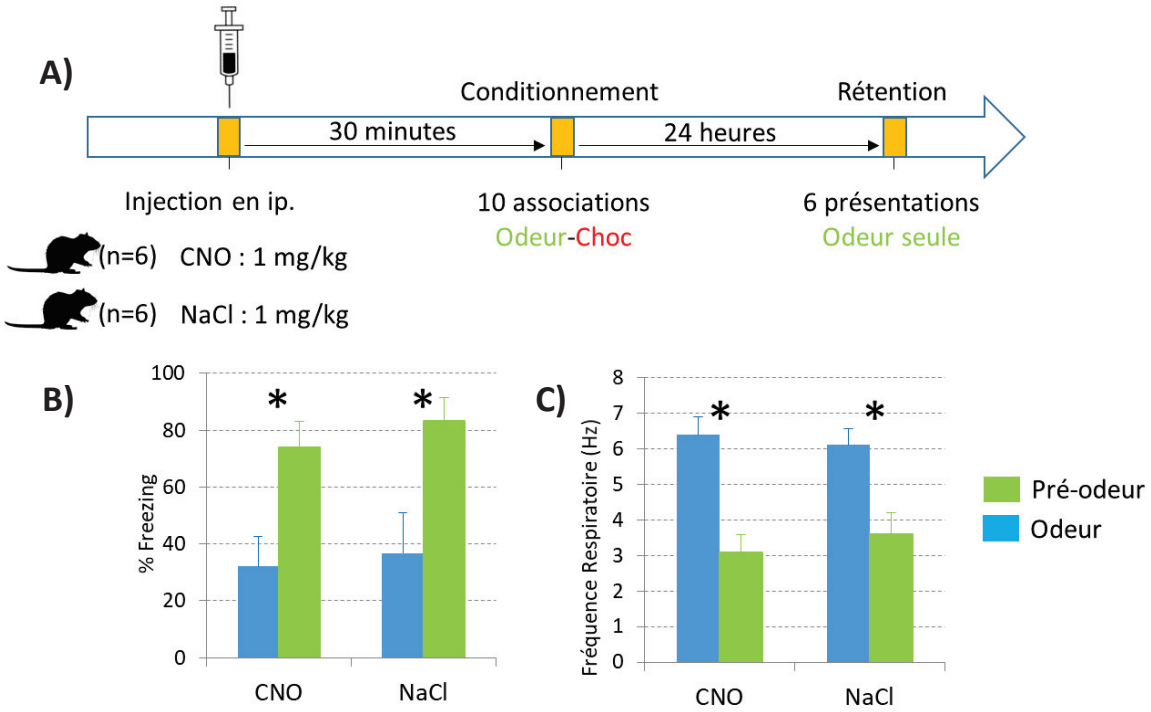


Figure 52 : *Influence du CNO sur le conditionnement de peur. A) Déroulé de l'expérience. B) Mesure du pourcentage de freezing (± sem) entre la période pré-odeur et odeur, pour les groupes CNO et NaCl. C) Mesure de la fréquence respiratoire moyenne (± sem) entre la période pré-odeur et odeur, pour les groupes CNO et NaCl. * indique une différence significative entre les deux périodes (p<0.05).*

3. Rôle de l'hippocampe

Bien que les études consacrées aux activités oscillatoires dans l'encodage du temps sont encore pauvres, nous avons vu dans l'introduction de l'étude 2 sur la mémoire temporelle que l'hippocampe serait également impliqué dans l'encodage du temps. Notamment, Nakazono et al. (2015) ont montré l'implication des oscillations thêta (4-9Hz) de l'hippocampe dans une tâche de discrimination temporelle. D'autre part, Tort et al. (2018) ont montré que des oscillations couplées à la respiration pouvaient être détectées dans l'hippocampe.

Pour des raisons inhérentes à notre dispositif télémétrique d'enregistrement des potentiels de champs locaux (limitation à 4 voies d'acquisition), nous n'avons pas pu enregistrer les activités oscillatoires dans l'hippocampe. Mais au vu de la littérature à ce sujet, il serait intéressant dans le futur d'analyser les oscillations dans cette structure en parallèle de l'enregistrement de la respiration, des USV et du freezing dans la tâche de conditionnement de peur à l'odeur.

Si l'on se replace dans le modèle SBF, on peut penser par exemple qu'au début de l'intervalle à encoder, la respiration va permettre la synchronisation de différentes structures, comme nous l'avons décrit plus haut, mais également la synchronisation de l'hippocampe. Cette synchronisation déclencherait alors la modulation du seuil de décharge des neurones épineux du striatum par l'hippocampe via une inhibition tonique ou une excitation phasique (Yin et Troger, 2011).

Bibliographie

A

Agostino PV, Cheng RK (2016). Contributions of dopaminergic signaling to timing accuracy and precision. Current Opinion in Behavioral Sciences*, 8,* 153-160.

Allen TA, Furtak SC, Brown TH (2007) Single-unit responses to 22 kHz ultrasonic vocalizations in rat perirhinal cortex. Behav Brain Res 182:327-336.

Anagnostaras SG, Maren S, Fanselow MS (1999) Temporally graded retrograde amnesia of contextual fear after hippocampal damage in rats: within-subjects examination. J Neurosci 19:1106-1114.

Annese J, Schenker-Ahmed NM, Bartsch H, Maechler P, Sheh C, Thomas N, Kayano J, Ghatan A, Bresler N, Frosch MP, Klaming R, Corkin S (2014) Postmortem examination of patient H.M.'s brain based on histological sectioning and digital 3D reconstruction. Nat Commun 5:3122.

Antoniadis EA, McDonald RJ (1999) Discriminative fear conditioning to context expressed by multiple measures of fear in the rat. Behav Brain Res 101:1-13.

Apicella P, Scarnati E, Ljungberg T, Schultz W (1992) Neuronal activity in monkey striatum related to the expectation of predictable environmental events. J Neurophysiol 68:945-960.

Arakawa H, Blanchard DC, Arakawa K, Dunlap C, Blanchard RJ (2008) Scent marking behavior as an odorant communication in mice. Neurosci Biobehav Rev. 32(7):1236-48.

Arnsten AF, Rubia K (2012) Neurobiological circuits regulating attention, cognitive control, motivation, and emotion: disruptions in neurodevelopmental psychiatric disorders. J Am Acad Child Adolesc Psychiatry 51:356-367.

Assini R, Sirotin YB, Laplagne DA (2013) Rapid triggering of vocalizations following social interactions. Curr Biol 23:R996-R997.

Awad W, Ferreira G, Maroun M (2015) Dissociation of the Role of Infralimbic Cortex in Learning and Consolidation of Extinction of Recent and Remote Aversion Memory. Neuropsychopharmacology 40:2566-2575.

B

Bagur S, Lefort JM, Lacroix MM, de Lavilléon G, Herry C, Billand C, Geoffroy H, Benchenane K (2018) Dissociation of fear initiation and maintenance by breathing-driven prefrontal oscillations, bioRxiv DOI: 10.1101/468264

Balsam PD, Gallistel CR (2009) Temporal maps and informativeness in associative learning. Trends Neurosci 32:73-78.

Balsam PD, Drew MR, Gallistel CR (2010) Time and Associative Learning. Comp Cogn Behav Rev 5:1-22.

Barkai E (2014) Neural mechanisms of odor rule learning. Prog Brain Res 208:253-274.

Barnes DC, Chapuis J, Chaudhury D, Wilson DA (2011) Odor fear conditioning modifies piriform cortex local field potentials both during conditioning and during post-conditioning sleep. PLoS One 6:e18130.

Bauer EP, Paz R, Pare D (2007) Gamma oscillations coordinate amygdalo-rhinal interactions during learning. J Neurosci 27:9369-9379.

Bechara A, Tranel D, Damasio H, Adolphs R, Rockland C, Damasio AR (1995) Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. Science 269:1115-1118.

Beck A (1891) Determination of Localization in the Brain and Spinal Cord by Means of Electrical Phenomena. Polsk Akad Um, Series II I: 186–232.

Beckett SR, Duxon MS, Aspley S, Marsden CA (1997) Central c-fos expression following 20kHz/ultrasound induced defence behaviour in the rat. Brain Res Bull 42:421-426.

Belova MA, Paton JJ, Morrison SE, Salzman CD (2007) Expectation modulates neural responses to pleasant and aversive stimuli in primate amygdala. Neuron 55:970-984.

Bennett PJG, Maier E, Brecht M (2019) Involvement of rat posterior prelimbic and cingulate area 2 in vocalization control. Eur J Neurosci.

Berger H (1929) Uber das Elektrenkephalogramm des Menschen. I. Mitteilung. Arch. F. Psychiat. 87, 527–570 10.1007/BF01797193.

Bermudez MA, Gobel C, Schultz W (2012) Sensitivity to temporal reward structure in amygdala neurons. Curr Biol 22:1839-1844.

Biskamp J, Bartos M, Sauer JF (2017) Organization of prefrontal network activity by respiration-related oscillations. Sci Rep 7:45508.

Blanchard RJ, Blanchard DC (1969) Crouching as an index of fear. J Comp Physiol Psychol 67:370-375.

Blanchard RJ, Blanchard DC (1989) Attack and defense in rodents as ethoexperimental models for the study of emotion. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 13 Suppl:S3-14.

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

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

Blanchard RJ, Agullana R, McGee L, Weiss S, Blanchard DC (1992) Sex differences in the incidence and sonographic characteristics of antipredator ultrasonic cries in the laboratory rat (Rattus norvegicus). J Comp Psychol 106:270-277.

Bocchio M, Nabavi S, Capogna M (2017) Synaptic plasticity, engrams, and network oscillations in amygdala circuits for storage and retrieval of emotional memories. Neuron. 94:731–743.

Boiten FA (1998) The effects of emotional behaviour on components of the respiratory cycle. Biol Psychol. 49(1-2):29-51.

Bolles RC (1970). Species-specific defense reactions and avoidance learning. Psychol Rev 77: 32–48.

Borta A, Wohr M, Schwarting RK (2006) Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. Behav Brain Res 166:271-280.

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

Boulanger-Bertolus J, Rincon-Cortes M, Sullivan RM, Mouly AM (2017) Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. Sci Rep 7:13483.

Brennan PA, Keverne EB (1997) Neural mechanisms ofmammalian olfactory learning. Prog Neurobiol. 51: 457–481.

Brennan PA, Kendrick KM (2006) Mammalian social odours: attraction and individual recognition. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 361:2061-2078.

Bressler SL (1988) Changes in electrical activity of rabbit olfactory bulb and cortex to conditioned odor stimulation. Behav Neurosci 102:740-747.

Bressler SL, Kelso JA (2001) Cortical coordination dynamics and cognition. Trends Cogn Sci 5:26-36.

Brodal A (1947) The amygdaloid nucleus in the rat. J Comp Neurol 87:1-16.

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

Brudzynski SM, Bihari F, Ociepa D, Fu XW (1993) Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: long and short calls. Physiol Behav 54:215-221.

Brudzynski SM (1994) Ultrasonic vocalization induced by intracerebral carbachol in rats: localization and a dose-response study. Behav Brain Res 63:133-143.

Brudzynski SM, Chiu EM (1995) Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. Physiol Behav 57:1039-1044.

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

Brudzynski SM, Pniak A (2002) Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. J Comp Psychol 116:73-82.

Brudzynski SM, Iku A, Harness Nee Savoy A (2011) Activity of cholinergic neurons in the laterodorsal tegmental nucleus during emission of 22kHz vocalization in rats. Behav Brain Res 225:276-283.

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

Brudzynski SM (2015) Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats: Significance, Call Classification and Neural Substrate. Curr Neuropharmacol 13:180-192.

Buck L, Axel R (1991) A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. Cell 65:175-187.

Bueti D, Bahrami B, Walsh V (2008) Sensory and association cortex in time perception. J Cogn Neurosci 20:1054-1062.

Bueti D (2011) The sensory representation of time. Front Integr Neurosci 5:34.

Buhusi CV, Meck WH (2005) What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing. Nat Rev Neurosci 6:755-765.

Buonviso N, Chaput MA, Scott JW (1991) Mitral cell-to-glomerulus connectivity: an HRP study of the orientation of mitral cell apical dendrites. J Comp Neurol 307:57-64.

Buonviso N, Amat C, Litaudon P, Roux S, Royet JP, Farget V, Sicard G (2003) Rhythm sequence through the olfactory bulb layers during the time window of a respiratory cycle. Eur J Neurosci 17:1811-1819.

Buonviso N, Amat C, Litaudon P (2006) Respiratory modulation of olfactory neurons in the rodent brain. Chem Senses 31:145-154.

Burgdorf J, Knutson B, Panksepp J, Ikemoto S (2001) Nucleus accumbens amphetamine microinjections unconditionally elicit 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats. Behav Neurosci 115:940-944.

Burgdorf J, Wood PL, Kroes RA, Moskal JR, Panksepp J (2007) Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. Behav Brain Res 182:274-283.

Burgdorf J, Kroes RA, Moskal JR, Pfaus JG, Brudzynski SM, Panksepp J (2008) Ultrasonic vocalizations of rats (Rattus norvegicus) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. J Comp Psychol 122:357-367.

Buzsaki G (2002) Theta oscillations in the hippocampus. Neuron 33:325-340.

Buzsaki G, Wang XJ (2012) Mechanisms of gamma oscillations. Annu Rev Neurosci 35:203-225.

C**Calu DJ**, Roesch MR, Stalnaker TA, Schoenbaum G (2007) Associative encoding in posterior piriform cortex during odor discrimination and reversal learning. Cereb Cortex 17:1342-1349.

Campeau S, Miserendino MJ, Davis M (1992) Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5 blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. Behav Neurosci 106:569-574.

Campeau S, Davis M (1995) Involvement of the central nucleus and basolateral complex of the amygdala in fear conditioning measured with fear-potentiated startle in rats trained concurrently with auditory and visual conditioned stimuli. J Neurosci 15:2301-2311.

Carlson KS, Dillione MR, Wesson DW (2014) Odor- and state-dependent olfactory tubercle local field potential dynamics in awake rats. J Neurophysiol 111:2109-2123.

Carmichael ST, Clugnet MC, Price JL (1994) Central olfactory connections in the macaque monkey. J Comp Neurol 346:403-434.

Carrive P (1993) The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. Behav Brain Res 58:27-47.

Cassel JC, Pereira de Vasconcelos A, Loureiro M, Cholvin T, Dalrymple-Alford JC, Vertes RP (2013) The reuniens and rhomboid nuclei: neuroanatomy, electrophysiological characteristics and behavioral implications. Prog Neurobiol 111:34-52.

Caton R (1875) The electric currents of the brain. Br. Med. J. 2, 278.

Cenier T, Amat C, Litaudon P, Garcia S, Lafaye de Micheaux P, LiquetB, Roux S, Buonviso N (2008) Odor vapor pressure and qualitymodulate LFP oscillatory patterns in the olfactory bulb of anesthetized rat.Eur. J. Neurosci.,27, 1432–1442.

Cenier T, David F, Litaudon P, Garcia S, Amat C, Buonviso N (2009) Respiration-gated formation of gamma and beta neural assemblies in the mammalian olfactory bulb. Eur J Neurosci 29:921-930.

Choi JS, Brown TH (2003) Central amygdala lesions block ultrasonic vocalization and freezing as conditional but not unconditional responses. J Neurosci 23:8713-8721.

Choi JS, Kim JJ (2010) Amygdala regulates risk of predation in rats foraging in a dynamic fear environment. PNAS. 107(50):21773-7

Chu S, Downes JJ (2002) Proust nose best: odors are better cues of autobiographical memory. Mem Cognit 30:511-518.

Church RM, Deluty MZ (1977) Bisection of temporal intervals. J Exp Psychol Anim Behav Process 3:216-228.

Claparede E (1995) Recognition and selfhood. Conscious Cogn 4:371-378.

Cohen NJ, Squire LR (1980) Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. Science 210:207-210.

Cohen Y, Reuveni I, Barkai E, Maroun M (2008) Olfactory learning-induced long-lasting enhancement of descending and ascending synaptic transmission to the piriform cortex. J Neurosci 28:6664-6669.

Corona R, Levy F (2015) Chemical olfactory signals and parenthood in mammals. Horm Behav 68:77-90.

Coull JT, Cheng RK, Meck WH (2011) Neuroanatomical and neurochemical substrates of timing. Neuropsychopharmacology 36:3-25.

Courtin J, Chaudun F, Rozeske RR, Karalis N, Gonzalez-Campo C, Wurtz H, Abdi A, Baufreton J, Bienvenu TC, Herry C (2014) Prefrontal parvalbumin interneurons shape neuronal activity to drive fear expression. Nature 505:92-96.

Courtiol E, Wilson DA (2016) Neural Representation of Odor-Guided Behavior in the Rat Olfactory Thalamus. J Neurosci 36:5946-5960.

Cousens G, Otto T (1998) Both pre- and posttraining excitotoxic lesions of the basolateral amygdala abolish the expression of olfactory and contextual fear conditioning. Behav Neurosci 112:1092-1103.

Cuomo V, Cagiano R, De Salvia MA, Maselli MA, Renna G, Racagni G (1988) Ultrasonic vocalization in response to unavoidable aversive stimuli in rats: effects of benzodiazepines. Life Sci 43:485-491.

D**Dallerac G**, Graupner M, Knippenberg J, Martinez RC, Tavares TF, Tallot L, El Massioui N, Verschueren A, Hohn S, Bertolus JB, Reyes A, LeDoux JE, Schafe GE, Diaz-Mataix L, Doyere V (2017) Updating temporal expectancy of an aversive event engages striatal plasticity under amygdala control. Nat Commun 8:13920.

Damasio A (1999) Le Sentiment même de soi. Corps, émotions, conscience, Paris, Odile Jacob.

Darwin C (1872) L'expression des émotions chez l'homme et les animaux. Paris: C. Reinwald, 2ème édition, 1890.

Datiche F, Cattarelli M (1996) Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: a tracing study using the B subunit of the cholera toxin. Brain Res Bull 41:391-398.

Davis M, Schlesinger LS, Sorenson CA (1989) Temporal specificity of fear conditioning: effects of different conditioned stimulus-unconditioned stimulus intervals on the fear-potentiated startle effect. J Exp Psychol Anim Behav Process 15:295-310.

De Boer SF, Koolhaas JM (2003) Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. Eur J Pharmacol 463:145-161.

De Kloet ER, Joels M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci 6:463-475.

De Waal FBM, Preston SD (2017) Mammalian empathy: behavioural manifestations and neural basis. Nat Rev Neurosci 18:498-509.

Delamater AR, Desouza A, Rivkin Y, Derman R (2014) Associative and temporal processes: a dual process approach. Behav Processes 101:38-48.

Deshmukh SS, Bhalla US (2003) Representation of odor habituation and timing in the hippocampus. J Neurosci 23:1903-1915.

Devito LM, Eichenbaum H (2011) Memory for the order of events in specific sequences: contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex. J Neurosci 31:3169-3175.

Dias BG, Ressler KJ (2014) Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. Nat Neurosci 17:89-96.

Diaz-Mataix L, Ruiz Martinez RC, Schafe GE, LeDoux JE, Doyere V (2013) Detection of a temporal error triggers reconsolidation of amygdala-dependent memories. Curr Biol 23:467-472.

Dielenberg RA, Leman S, Carrive P (2004) Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats. Behav Brain Res 153:487-496.

Donnelly NA, Paulsen O, Robbins TW, Dalley JW (2015) Ramping single unit activity in the medial prefrontal cortex and ventral striatum reflects the onset of waiting but not imminent impulsive actions. Eur J Neurosci 41:1524-1537.

Doyere V, Debiec J, Monfils MH, Schafe GE, LeDoux JE (2007) Synapse-specific reconsolidation of distinct fear memories in the lateral amygdala. Nat Neurosci 10:414-416.

Drew MR, Fairhurst S, Malapani C, Horvitz JC, Balsam PD (2003) Effects of dopamine antagonists on the timing of two intervals. Pharmacol Biochem Behav 75:9-15.

Drew MR, Zupan B, Cooke A, Couvillon PA, Balsam PD (2005) Temporal control of conditioned responding in goldfish. J Exp Psychol Anim Behav Process 31:31-39.

Duchamp-Viret P, Chaput MA, Duchamp A (1999) Odor response properties of rat olfactory receptor neurons. Science 284:2171-2174.

E

Ebbinghaus H (1885) Über das Gedächtnis. Paris: PUF, coll. "Bibliothèque du collège international de philosophie", 1998.

Edeline JM, Dutrieux G, Neuenschwander-el Massioui N (1988) Multiunit changes in hippocampus and medial geniculate body in free-behaving rats during acquisition and retention of a conditioned response to a tone. Behav Neural Biol 50:61-79.

Ekman, P (1984) Expression and the Nature of Emotion. In Scherer, K. & Ekman, P. (Eds.), Approaches to Emotion (pp. 319-343). Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum.

Eeckman FH, Freeman WJ (1990) Correlations between unit firing and EEG in the rat olfactory system. Brain Res 528:238-244.

Eichenbaum H, Kuperstein M, Fagan A, Nagode J (1987) Cue-sampling and goal-approach correlates of hippocampal unit activity in rats performing an odor-discrimination task. J Neurosci 7:716-732.

Eichenbaum H (2014) Time cells in the hippocampus: a new dimension for mapping memories. Nat Rev Neurosci 15:732-744.

Emmons EB, De Corte BJ, Kim Y, Parker KL, Matell MS, Narayanan NS (2017) Rodent Medial Frontal Control of Temporal Processing in the Dorsomedial Striatum. J Neurosci 37:8718-8733.

Engel AK, Fries P, Singer W (2001) Dynamic predictions: oscillations and synchrony in top-down processing. Nat Rev Neurosci 2:704-716.

Engel AK, Singer WS (2001) «Temporal binding and the neural correlates of sensory awarness », TRENDS in Cognitive Sciences, 5(1): 16-25.

Es-seddiqi M, El Massioui N, Samson N, Brown BL, Doyere V (2016) The amygdalo-nigrostriatal network is critical for an optimal temporal performance. Learn Mem 23:104-107.

F

Fanselow MS (1990). Factors governing one-trial contextual conditioning. Anim Learn Behav 18: 264–270.

Fanselow MS (1994) Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. Psychon Bull Rev 1:429-438.

Fanselow MS, Kim JJ (1994) Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. Behav Neurosci 108:210-212.

Fanselow MS (2000) Contextual fear, gestalt memories, and the hippocampus. Behav Brain Res 110:73-81.

Feinstein JS, Adolphs R, Damasio A, Tranel D (2011) The human amygdala and the induction and experience of fear. Curr Biol 21:34-38.

Fenton GE, Halliday DM, Mason R, Bredy TW, Stevenson CW (2016) Sex differences in learned fear expression and extinction involve altered gamma oscillations in medial prefrontal cortex. Neurobiol Learn Mem 135:66-72.

Fletcher ML (2012) Olfactory aversive conditioning alters olfactory bulb mitral/tufted cell glomerular odor responses. Front Syst Neurosci 6:16.

Fontanini A, Spano P, Bower JM (2003) Ketamine-xylazine-induced slow (< 1.5 Hz) oscillations in the rat piriform (olfactory) cortex are functionally correlated with respiration. J Neurosci 23:7993-8001.

Fontanini A, Bower JM (2005) Variable coupling between olfactory system activity and respiration in ketamine/xylazine anesthetized rats. J Neurophysiol 93:3573-3581.

Fortin NJ, Agster KL, Eichenbaum HB (2002) Critical role of the hippocampus in memory for sequences of events. Nat Neurosci 5:458-462.

Freeman WJ, Schneider W (1982) Changes in spatial patterns of rabbit olfactory EEG with conditioning to odors. Psychophysiology 19:44-56.

Freeman WJ (1991) « The physiology of perception », Scientific American, 264(2): 78-85.

Fries P (2005) A mechanism for cognitive dynamics: neuronal communication through neuronal coherence. Trends Cogn Sci 9:474-480.

Fries P (2015) Rhythms for Cognition: Communication through Coherence. Neuron 88:220-235.

Frysztak RJ, Neafsey EJ (1991) The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, "freezing," and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. Cereb Cortex 1:418-425.

Funk D, Amir S (2000) Circadian modulation of fos responses to odor of the red fox, a rodent predator, in the rat olfactory system. Brain Res 866:262-267.

G

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. J Comp Neurol 492:145-177.

Gagliano M, Vyazovskiy VV, Borbely AA, Grimonprez M, Depczynski M (2016) Learning by Association in Plants. Sci Rep 6:38427.

Ghose GM, Maunsell JH (2002) Attentional modulation in visual cortex depends on task timing. Nature 419:616-620.

Gibbon J (1977). Scalar expectancy theory and Weber's law in animal timing. Psychol Rev 84: 279–325.

Gloveli T, Dugladze T, Rotstein HG, Traub RD, Monyer H, Heinemann U, Whittington MA, Kopell NJ (2005) Orthogonal arrangement of rhythm-generating microcircuits in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 102:13295-13300.

Goosens KA, Holt W, Maren S (2000) A role for amygdaloid PKA and PKC in the acquisition of long-term conditional fear memories in rats. Behav Brain Res 114:145-152.

Goosens KA, Maren S (2001) Contextual and auditory fear conditioning are mediated by the lateral, basal, and central amygdaloid nuclei in rats. Learn Mem 8:148-155.

Gouvea TS, Monteiro T, Motiwala A, Soares S, Machens C, Paton JJ (2015) Striatal dynamics explain duration judgments. Elife 4.

Gray P (2011). Psychology (6th ed.) New York : Worth Publishers

Gray CM, Skinner JE (1988) Field potential response changes in the rabbit olfactory bulb accompany behavioral habituation during the repeated presentation of unreinforced odors. Exp Brain Res 73:189-197.

Grosmaitre X, Santarelli LC, Tan J, Luo M, Ma M (2007) Dual functions of mammalian olfactory sensory neurons as odor detectors and mechanical sensors. Nat Neurosci 10:348-354.

H

Haberly LB, Price JL (1977) The axonal projection patterns of the mitral and tufted cells of the olfactory bulb in the rat. Brain Res 129:152-157.

Haberly LB, Price JL (1978) Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. J Comp Neurol 178:711-740.

Haberly LB (2001) Parallel-distributed processing in olfactory cortex: new insights from morphological and physiological analysis of neuronal circuitry. Chem Senses 26:551-576.

Harrington DL, Castillo GN, Greenberg PA, Song DD, Lessig S, Lee RR, Rao SM (2011) Neurobehavioral mechanisms of temporal processing deficits in Parkinson's disease. PLoS One 6:e17461.

Headley DB, Weinberger NM (2011) Gamma-band activation predicts both associative memory and cortical plasticity. J Neurosci 31:12748-12758.

Headley DB, Pare D (2013) In sync: gamma oscillations and emotional memory. Front Behav Neurosci 7:170.

Headley DB, Weinberger NM (2013) Fear conditioning enhances gamma oscillations and their entrainment of neurons representing the conditioned stimulus. J Neurosci 33:5705-5717.

Hebb D (1949) The organisation of behaviour. New York, NY: John Wiley and Sons.
Heck DH, McAfee SS, Liu Y, Babajani-Feremi A, Rezaie R, Freeman WJ, Wheless JW, Papanicolaou AC, Ruszinko M, Sokolov Y, Kozma R (2016) Breathing as a Fundamental Rhythm of Brain Function. Front Neural Circuits 10:115.

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

Hegoburu C, Shionoya K, Garcia S, Messaoudi B, Thevenet M, Mouly AM (2011) The RUB Cage: Respiration-Ultrasonic Vocalizations-Behavior Acquisition Setup for Assessing Emotional Memory in Rats. Front Behav Neurosci 5:25.

Hegoburu C, Parrot S, Ferreira G, Mouly AM (2014) Differential involvement of amygdala and cortical NMDA receptors activation upon encoding in odor fear memory. Learn Mem 21:651-655.

Helmstetter FJ, Bellgowan PS (1994) Effects of muscimol applied to the basolateral amygdala on acquisition and expression of contextual fear conditioning in rats. Behav Neurosci 108:1005-1009.

Herry C, Bach DR, Esposito F, Di Salle F, Perrig WJ, Scheffler K, Luthi A, Seifritz E (2007) Processing of temporal unpredictability in human and animal amygdala. J Neurosci 27:5958-5966.

Herz RS, Eliassen J, Beland S, Souza T (2004) Neuroimaging evidence for the emotional potency of odor-evoked memory. Neuropsychologia 42:371-378.

Herzog C, Otto T (1997) Odor-guided fear conditioning inrats: 2. Lesions of the anterior perirhinal cortex disrupt fearconditioned to the explicit CS but not to the training context.Behavioral Neuroscience, 111

Hinton PB, Henley TB (1993) Cognitive and affective components of stimuli presented in three modes Bull. Psychon. Soc. 31: 595

Hofer MA (1996) Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. Psychoneuroendocrinology 21:203-217.

Hohn S, Dallerac G, Faure A, Urbach YK, Nguyen HP, Riess O, von Horsten S, Le Blanc P, Desvignes N, El Massioui N, Brown BL, Doyere V (2011) Behavioral and in vivo electrophysiological evidence for presymptomatic alteration of prefrontostriatal processing in the transgenic rat model for huntington disease. J Neurosci 31:8986-8997.

Holstege G (2014) The periaqueductal gray controls brainstem emotional motor systems including respiration. Prog Brain Res 209:379-405.

Homma I, Masaoka Y (2008) Breathing rhythms and emotions. Exp Physiol. 93(9):1011-21.

Hoover WB, Vertes RP (2007) Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. Brain Struct Funct 212:149-179.

Hyafil A, Giraud AL, Fontolan L, Gutkin B (2015) Neural Cross-Frequency Coupling: Connecting Architectures, Mechanisms, and Functions. Trends Neurosci 38:725-740.

I **Ito J**, Roy S, Liu Y, Cao Y, Fletcher M, Lu L, Boughter JD, Grun S, Heck DH (2014) Whisker barrel cortex delta oscillations and gamma power in the awake mouse are linked to respiration. Nat Commun 5:3572.

Iwata J, Chida K, LeDoux JE (1987) Cardiovascular responses elicited by stimulation of neurons in the central amygdaloid nucleus in awake but not anesthetized rats resemble conditioned emotional responses. Brain Res 418:183-188.

J **Jacobs NS**, Allen TA, Nguyen N, Fortin NJ (2013) Critical role of the hippocampus in memory for elapsed time. J Neurosci 33:13888-13893.

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

Johnson AM, Ciucci MR, Russell JA, Hammer MJ, Connor NP (2010) Ultrasonic output from the excised rat larynx. J Acoust Soc Am 128:EL75-79.

Jones SV, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ (2007) Differential regional expression of brain-derived neurotrophic factor following olfactory fear learning. Learn Mem 14:816-820.

Jones SV, Choi DC, Davis M, Ressler KJ (2008) Learning-dependent structural plasticity in the adult olfactory pathway. J. Neurosci. 28, 13106–13111.

Jurgens U (1994) The role of the periaqueductal grey in vocal behaviour. Behav Brain Res 62:107-117.

Jurgens U (2002) Neural pathways underlying vocal control. Neurosci Biobehav Rev 26:235-258.

K

Kadohisa M, Wilson DA (2006) Separate encoding of identity and similarity of complex familiar odors in piriform cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 103:15206-15211.

Kalin NH, Shelton SE (1989) Defensive behaviors in infant rhesus monkeys: environmental cues and neurochemical regulation. Science 243:1718-1721.

Kapp BS, Gallagher M, Underwood MD, McNall CL, Whitehorn D (1982) Cardiovascular responses elicited by electrical stimulation of the amygdala central nucleus in the rabbit. Brain Res 234:251-262.

Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J, Herry C (2016) 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. Nat Neurosci 19:605-612.

Karalis N, Sirota A (2018) Breathing coordinates limbic network dynamics underlying memory consolidation. bioRxiv (Preprint).

Karmarkar UR, Buonomano DV (2007) Timing in the absence of clocks: encoding time in neural network states. Neuron 53:427-438.

Kass MD, Rosenthal MC, Pottackal J, McGann JP (2013) Fear learning enhances neural responses to threat-predictive sensory stimuli. Science 342:1389-1392.

Kass MD, McGann JP (2017) Persistent, generalized hypersensitivity of olfactory bulb interneurons after olfactory fear generalization. Neurobiol Learn Mem 146:47-57.

Kay LM, Beshel J, Brea J, Martin C, Rojas-Libano D, Kopell N (2009) Olfactory oscillations: the what, how and what for. Trends Neurosci 32:207-214.

Kay LM (2014) Circuit oscillations in odor perception and memory. Prog Brain Res 2014;208:223-51 doi: 101016/B978-0-444-63350-700009-7.

Keele SW, Pokorny RA, Corcos DM, Ivry R. (1985). Do perception and motor production share common timing mechanisms: A correlational analysis. Acta Psychol (Amst) 60: 173–191.

Keifer OP, Jr., Hurt RC, Ressler KJ, Marvar PJ (2015) The Physiology of Fear: Reconceptualizing the Role of the Central Amygdala in Fear Learning. Physiology (Bethesda) 30:389-401.

Kelley AE, Domesick VB, Nauta WJ (1982) The amygdalostriatal projection in the rat--an anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. Neuroscience 7:615-630.

Keverne EB (2004) Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. Physiol Behav 83:177-187.

Kilpatrick L, Cahill L (2003) Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. Behav Neurosci 117:184-188.

Kim JJ, Fanselow MS (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. Science 256:675-677.

Kim M, Davis M (1993) Lack of a temporal gradient of retrograde amnesia in rats with amygdala lesions assessed with the fear-potentiated startle paradigm. Behav Neurosci 107:1088-1092.

Kim J, Jung AH, Byun J, Jo S, Jung MW (2009) Inactivation of medial prefrontal cortex impairs time interval discrimination in rats. Front Behav Neurosci 3:38.

Kim J, Ghim JW, Lee JH, Jung MW (2013) Neural correlates of interval timing in rodent prefrontal cortex. J Neurosci 33:13834-13847.

Kim J, Ghim JW, Lee JH, Jung MW (2013) Neural correlates of interval timing in rodent prefrontal cortex. J Neurosci 33:13834-13847.

Klüver H, Bucy PC (1939) Preliminary analysis of functions of the temporal lobes in monkeys. Arch NeurPsych, vol. 42, no 6, p. 979-1000.

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

Koch G, Oliveri M, Carlesimo GA, Caltagirone C (2002) Selective deficit of time perception in a patient with right prefrontal cortex lesion. Neurology 59:1658-1659.

Kononowicz TW (2015) Dopamine-dependent oscillations in frontal cortex index "start-gun" signal in interval timing. Front Hum Neurosci 9:331.

Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJ (2013) The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. J Vis Exp:e4367.

Koszeghy A, Lasztoczi B, Forro T, Klausberger T (2018) Spike-Timing of Orbitofrontal Neurons Is Synchronized With Breathing. Front Cell Neurosci 12:105.

Krettek JE, Price JL (1977) Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat. J Comp Neurol 172:723-752.

Krettek JE, Price JL (1978) A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections. J Comp Neurol 178:255-280.

L

LeDoux JE, Cicchetti P, Xagoraris A, Romanski LM (1990) The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. J Neurosci 10:1062-1069.

LeDoux JE (1996) The emotional brain: the mysterious underpinnings of emotional life. Simon & Schuster, New York.
LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. Annu Rev Neurosci 23:155-184.

Lee JL (2009) Reconsolidation: maintaining memory relevance. Trends Neurosci 32:413-420.

Lee S, Kim SJ, Kwon OB, Lee JH, Kim JH (2013) Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. Front Neural Circuits 7:129.

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

Lenell C, Newkirk B, Johnson AM (2019) Laryngeal Neuromuscular Response to Short- and Long-Term Vocalization Training in Young Male Rats. J Speech Lang Hear Res 62:247-256.

Lesting J, Narayanan RT, Kluge C, Sangha S, Seidenbecher T, Pape HC (2011) Patterns of coupled theta activity in amygdala-hippocampal-prefrontal cortical circuits during fear extinction. PLoS One 6:e21714.

Ley R (1999) The modification of breathing behavior: Pavlovian and operant control in emotion and cognition. Behavior Modification. 23(3):441–479.

Liebetanz D, Nitsche M, Fromm C, Reyher CK (2002) Central olfactory connections in the microsmatic marmoset monkey (Callithrix jacchus). Cells Tissues Organs 172:53-69.

Li A, Gire DH, Bozza T, Restrepo D (2014) Precise detection of direct glomerular input duration by the olfactory bulb. J Neurosci. 34(48):16058-64.

Li SS, McNally GP (2014) The conditions that promote fear learning: prediction error and Pavlovian fear conditioning. Neurobiol Learn Mem.108:14-21.

Likhtik E, Stujenske JM, Topiwala MA, Harris AZ, Gordon JA (2014) Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. Nat Neurosci 17:106-113.

Lisman JE, Jensen O (2013) The theta-gamma neural code. Neuron 77:1002-1016.

Litaudon P, Herve T, Cattarelli M (1997) Evidence for synchronised responses in the piriform cortex by using Gibbs potential analysis. Biol Cybern 76:119-127.

Litaudon P, Amat C, Bertrand B, Vigouroux M, Buonviso N (2003) Piriform cortex functional heterogeneity revealed by cellular responses to odours. Eur J Neurosci 17:2457-2461.

Litaudon P, Garcia S, Buonviso N (2008) Strong coupling between pyramidal cell activity and network oscillations in the olfactory cortex. Neuroscience 156:781-787.

Lockmann AL, Laplagne DA, Leao RN, Tort AB (2016) A Respiration-Coupled Rhythm in the Rat Hippocampus Independent of Theta and Slow Oscillations. J Neurosci 36:5338-5352.

Lockmann ALV, Tort ABL (2018) Nasal respiration entrains delta-frequency oscillations in the prefrontal cortex and hippocampus of rodents. Brain Struct Funct 223:1-3.

Lockmann ALV, Laplagne DA, Tort ABL (2018) Olfactory bulb drives respiration-coupled beta oscillations in the rat hippocampus. Eur J Neurosci 48:2663-2673.

Lopuch S, Popik P (2011) Cooperative behavior of laboratory rats (Rattus norvegicus) in an instrumental task. J Comp Psychol 125:250-253.

Lowry CA, Kay LM (2007) Chemical factors determine olfactory system beta oscillations in waking rats. J Neurophysiol 98:394-404.

Luo Q, Holroyd T, Jones M, Hendler T, Blair J (2007) Neural dynamics for facial threat processing as revealed by gamma band synchronization using MEG. Neuroimage 34:839-847.

Luo Q, Mitchell D, Cheng X, Mondillo K, McCaffrey D, Holroyd T, Carver F, Coppola R, Blair J (2009) Visual awareness, emotion, and gamma band synchronization. Cereb Cortex 19:1896-1904.

Luskin MB, Price JL (1983) The topographic organization of associational fibers of the olfactory system in the rat, including centrifugal fibers to the olfactory bulb. J Comp Neurol 216:264-291.

Luskin MB, Price JL (1983) The laminar distribution of intracortical fibers originating in the olfactory cortex of the rat. J Comp Neurol 216:292-302.

M

MacDonald CJ, Lepage KQ, Eden UT, Eichenbaum H (2011) Hippocampal "time cells" bridge the gap in memory for discontiguous events. Neuron 71:737-749.

MacDonald CJ, Carrow S, Place R, Eichenbaum H (2013) Distinct hippocampal time cell sequences represent odor memories in immobilized rats. J Neurosci 33:14607-14616.

Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB (1999) Combinatorial receptor codes for odors. Cell 96:713-723.

Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1996) Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. Behav Neurosci 110:718-726.

Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1997) Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus and Pavlovian fear conditioning in rats. Behav Brain Res 88:261-274.

Maren S (2001) Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. Annu Rev Neurosci 24:897-931.

Martin LT, Alberts JR (1982) Associative learning in neonatal rats revealed by cardiac response patterns. J Comp Physiol Psychol 96:668-675.

Martin C, Gervais R, Hugues E, Messaoudi B, Ravel N (2004) Learning modulation of odor-induced oscillatory responses in the rat olfactory bulb: a correlate of odor recognition? J Neurosci 24:389-397.

Martin C, Gervais R, Messaoudi B, Ravel N (2006) Learning-induced oscillatory activities correlated to odour recognition: a network activity. Eur J Neurosci 23:1801-1810.

Martin C, Ravel N (2014) Beta and gamma oscillatory activities associated with olfactory memory tasks: different rhythms for different functional networks? Front Behav Neurosci 2014 Jun 23;8:218 doi: 103389/fnbeh201400218 eCollection 2014.

Matell MS, Meck WH (2000) Neuropsychological mechanisms of interval timing behavior. Bioessays 22:94-103.

Matell MS, Meck WH, Nicolelis MA (2003) Interval timing and the encoding of signal duration by ensembles of cortical and striatal neurons. Behav Neurosci 117:760-773.

Matell MS, Meck WH, Nicolelis MA (2003) Interval timing and the encoding of signal duration by ensembles of cortical and striatal neurons. Behav Neurosci 117:760-773.

Matthews AR, He OH, Buhusi M, Buhusi CV (2012) Dissociation of the role of the prelimbic cortex in interval timing and resource allocation: beneficial effect of norepinephrine and dopamine reuptake inhibitor nomifensine on anxiety-inducing distraction. Front Integr Neurosci 6:111.

Mau W, Sullivan DW, Kinsky NR, Hasselmo ME, Howard MW, Eichenbaum H (2018) The Same Hippocampal CA1 Population Simultaneously Codes Temporal Information over Multiple Timescales. Curr Biol 28:1499-1508 e1494.

McDonald AJ (1991) Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. Neuroscience 44:1-14.

McDonald AJ, Mascagni F, Guo L (1996) Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. Neuroscience 71:55-75.

McDonald AJ (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. Prog Neurobiol 55:257-332.

McGeer PL, McGeer EG, Scherer U, Singh K (1977) A glutamatergic corticostriatal path? Brain Res 128:369-373.

Meck WH, Church RM, Olton DS (1984) Hippocampus, time, and memory. Behav Neurosci 98:3-22.

Meck WH (2006a) Neuroanatomical localization of an internal clock: a functional link between mesolimbic, nigrostriatal, and mesocortical dopaminergic systems. Brain Res 1109:93-107.

Meck WH (2006b) Frontal cortex lesions eliminate the clock speed effect of dopaminergic drugs on interval timing. Brain Res 1108:157-167.

Meck WH, Macdonald CJ (2007) Amygdala inactivation reverses fear's ability to impair divided attention and make time stand still. Behav Neurosci 121:707-720.

Medina JF, Repa JC, Mauk MD, LeDoux JE (2002) Parallels between cerebellum- and amygdala-dependent conditioning. Nat Rev Neurosci 3:122-131.

Meissner-Bernard C, Dembitskaya Y, Venance L, Fleischmann A (2019) Encoding of Odor Fear Memories in the Mouse Olfactory Cortex. Curr Biol 29:367-380 e364.

Mello GB, Soares S, Paton JJ (2015) A scalable population code for time in the striatum. Curr Biol 25:1113-1122.

Meyer DE, Schvaneveldt RW (1971) Facilitation in recognizing pairs of words: evidence of a dependence between retrieval operations. J Exp Psychol 90:227-234.

Milad MR, Quirk GJ (2012) Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. Annu Rev Psychol 63:129-151.

Milner B (1962) In P. Passouant (Ed.), Physiologie de l'hippocampe (pp. 257-272).

Miller RR, Barnet RC. (1993). The role of time in elementary associations. Curr Dir Psychol Sci 2: 106–111.

Miserendino MJ, Sananes CB, Melia KR, Davis M (1990) Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. Nature 345:716-718.

Mobbs D (2018) The ethological deconstruction of fear(s). Curr Opin Behav Sci 24:32-37.

Moberly AH, Schreck M, Bhattarai JP, Zweifel LS, Luo W, Ma M (2018) Olfactory inputs modulate respiration-related rhythmic activity in the prefrontal cortex and freezing behavior. Nat Commun 9:1528.

Mori K (1995) Relation of chemical structure to specificity of response in olfactory glomeruli. Curr Opin Neurobiol 5:467-474.

Mori K, Nagao H, Yoshihara Y (1999) The olfactory bulb: coding and processing of odor molecule information. Science 286:711-715.

Moriceau S, Sullivan RM (2006) Maternal presence serves as a switch between learning fear and attraction in infancy. Nat Neurosci 9:1004-1006.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297:681-683.

Motanis H, Maroun M, Barkai E (2014) Learning-induced bidirectional plasticity of intrinsic neuronal excitability reflects the valence of the outcome. Cereb Cortex 24:1075-1087.

Mouly AM, Fort A, Ben-Boutayab N, Gervais R (2001) Olfactory learning induces differential long-lasting changes in rat central olfactory pathways. Neuroscience 102:11-21.

Moye TB, Rudy JW (1985) Ontogenesis of learning: VI. Learned and unlearned responses to visual stimulation in the infant hooded rat. Dev Psychobiol 18:395-409.

Murthy VN (2011) Olfactory maps in the brain. Annu Rev Neurosci 34:233-258.

N

Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. Nature 406:722-726.

Nader K, Majidishad P, Amorapanth P, LeDoux JE (2001) Damage to the lateral and central, but not other, amygdaloid nuclei prevents the acquisition of auditory fear conditioning. Learn Mem 8:156-163.

Nakazono T, Sano T, Takahashi S, Sakurai Y (2015) Theta oscillation and neuronal activity in rat hippocampus are involved in temporal discrimination of time in seconds. Front Syst Neurosci 9:95.

Narayanan NS, Laubach M (2006) Top-down control of motor cortex ensembles by dorsomedial prefrontal cortex. Neuron 52:921-931.

Narayanan RT, Seidenbecher T, Kluge C, Bergado J, Stork O, Pape HC (2007) Dissociated theta phase synchronization in amygdalo- hippocampal circuits during various stages of fear memory. Eur J Neurosci 25:1823-1831.

Narayanan NS, Land BB, Solder JE, Deisseroth K, DiLeone RJ (2012) Prefrontal D1 dopamine signaling is required for temporal control. Proc Natl Acad Sci U S A 109:20726-20731.

Neville KR, Haberly L. Olfactory cortex (2004) The Synaptic Organization of the Brain. 5th edition. New York: Oxford University Press; 2004. pp. 415–54.

Nguyen CV, Muller C, Wolfenstetter T, Yanovsky Y, Draguhn A, Tort AB, Brankack J (2016) Hippocampal Respiration-Driven Rhythm Distinct from Theta Oscillations in Awake Mice. J Neurosci 36:162-177.

O

Olton DS, Meck WH, Church RM (1987) Separation of hippocampal and amygdaloid involvement in temporal memory dysfunctions. Brain Res 404:180-188.

Oya H, Kawasaki H, Howard MA, 3rd, Adolphs R (2002) Electrophysiological responses in the human amygdala discriminate emotion categories of complex visual stimuli. J Neurosci 22:9502-9512.

P

Palouzier-Paulignan B, Lacroix MC, Aime P, Baly C, Caillol M, Congar P, Julliard AK, Tucker K, Fadool DA (2012) Olfaction under metabolic influences. Chem Senses 37:769-797.

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

Panksepp J, Knutson B, Burgdorf J (2002) The role of brain emotional systems in addictions: a neuro-evolutionary perspective and new 'self-report' animal model. Addiction 97:459-469.

Panksepp J (2005) Psychology. Beyond a joke: from animal laughter to human joy? Science 308:62-63.

Pape HC, Narayanan RT, Smid J, Stork O, Seidenbecher T (2005) Theta activity in neurons and networks of the amygdala related to long-term fear memory. Hippocampus 15:874-880.

Pare D, Collins DR (2000) Neuronal correlates of fear in the lateral amygdala: multiple extracellular recordings in conscious cats. J Neurosci 20:2701-2710.

Parker KL, Lamichhane D, Caetano MS, Narayanan NS (2013) Executive dysfunction in Parkinson's disease and timing deficits. Front Integr Neurosci 7:75.

Parker KL, Chen KH, Kingyon JR, Cavanagh JF, Narayanan NS (2014) D1-dependent 4 Hz oscillations and ramping activity in rodent medial frontal cortex during interval timing. J Neurosci 34:16774-16783.

Parker KL, Ruggiero RN, Narayanan NS (2015) Infusion of D1 Dopamine Receptor Agonist into Medial Frontal Cortex Disrupts Neural Correlates of Interval Timing. Front Behav Neurosci 9:294.

Parsana AJ, Li N, Brown TH (2012a) Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. Behav Brain Res 226:77-86.

Parsons TC, Otto T (2008) Temporary inactivation of dorsal hippocampus attenuates explicitly nonspatial, unimodal, contextual fear conditioning. Neurobiol Learn Mem 90:261-268.

Paulsen JS, Zimbelman JL, Hinton SC, Langbehn DR, Leveroni CL, Benjamin ML, Reynolds NC, Rao SM (2004) fMRI biomarker of early neuronal dysfunction in presymptomatic Huntington's Disease. AJNR Am J Neuroradiol 25:1715-1721.

Pavlov IP (1927) Conditioned reflexes. London: Oxford University Press, UK.

Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA (2007) An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. Proc Natl Acad Sci U S A 104:5638-5643.

Pessoa L, Adolphs R (2010) Emotion processing and the amygdala: from a 'low road' to 'many roads' of evaluating biological significance. Nat Rev Neurosci 11:773-783.

Phelps EA, LeDoux JE (2005) Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. Neuron 48:175-187.

Phillips RG, LeDoux JE (1992) Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. Behav Neurosci 106:274-285.

Picton TW, Stuss DT, Alexander MP, Shallice T, Binns MA, Gillingham S (2007) Effects of focal frontal lesions on response inhibition. Cereb Cortex 17:826-838.

Pikkarainen M, Ronkko S, Savander V, Insausti R, Pitkanen A (1999) Projections from the lateral, basal, and accessory basal nuclei of the amygdala to the hippocampal formation in rat. J Comp Neurol 403:229-260.

Plutchik R (2001) The Nature of Emotions. American Scientist. Vol. 89, No. 4, pp. 344-350.

Popa D, Duvarci S, Popescu AT, Lena C, Pare D (2010) Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. Proc Natl Acad Sci U S A 107:6516-6519.

Popescu AT, Popa D, Pare D (2009) Coherent gamma oscillations couple the amygdala and striatum during learning. Nat Neurosci 12:801-807.

Portfors CV (2007) Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. J Am Assoc Lab Anim Sci 46:28-34.

Raineki C, Shionoya K, Sander K, Sullivan RM (2009) Ontogeny of odor-LiCl vs. odor-shock learning: similar behaviors but divergent ages of functional amygdala emergence. Learn Mem 16:114-121.

Rescorla RA (1988) Pavlovian conditioning. It's not what you think it is. Am Psychol 43:151-160.

Rescorla RA (1988) Behavioral studies of Pavlovian conditioning. Annu Rev Neurosci 11:329-352.

Ressler KJ, Sullivan SL, Buck LB (1994) A molecular dissection of spatial patterning in the olfactory system. Curr Opin Neurobiol 4:588-596.

Riede T (2011) Subglottal pressure, tracheal airflow, and intrinsic laryngeal muscle activity during rat ultrasound vocalization. J Neurophysiol 106:2580-2592.

Righi S, Galli L, Paganini M, Bertini E, Viggiano MP, Piacentini S (2016) Time perception impairment in early-to-moderate stages of Huntington's disease is related to memory deficits. Neurol Sci 37:97-104.

Roberts LH (1972) Correlation of respiration and ultrasound production in rodents and bats. Journal of Zoology. 168(4):439–449.

Roberts LH (1975a) Evidence for the laryngeal source of ultrasonic and audible cries of rodents. J. Zool. 175, 243–257. 10.1111/j.1469-7998.1975.tb01399.x

Roberts S (1981) Isolation of an internal clock. J Exp Psychol Anim Behav Process.

Roesch MR, Stalnaker TA, Schoenbaum G (2007) Associative encoding in anterior piriform cortex versus orbitofrontal cortex during odor discrimination and reversal learning. Cereb Cortex 17:643-652.

Roesch MR, Calu DJ, Esber GR, Schoenbaum G (2010) Neural correlates of variations in event processing during learning in basolateral amygdala. J Neurosci 30:2464-2471.

Rojas-Libano D, Frederick DE, Egana JI, Kay LM (2014) The olfactory bulb theta rhythm follows all frequencies of diaphragmatic respiration in the freely behaving rat. Front Behav Neurosci 8:214.

Roozendaal B, Koolhaas JM, Bohus B (1991) Central amygdala lesions affect behavioral and autonomic balance during stress in rats. Physiol Behav 50:777-781.

Rosen JB, Schulkin J (1998) From normal fear to pathological anxiety. Psychol Rev 105:325-350.

Rosene DL, Van Hoesen GW (1977) Hippocampal efferents reach widespread areas of cerebral cortex and amygdala in the rhesus monkey. Science 198:315-317.

Rosenkranz JA, Grace AA (2002) Dopamine-mediated modulation of odour-evoked amygdala potentials during pavlovian conditioning. Nature 417:282-287.

S

Sacchetti B, Lorenzini CA, Baldi E, Tassoni G, Bucherelli C (1999) Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala, and perirhinal cortex role in the consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. J Neurosci 19:9570-9578.

Sacco T, Sacchetti B (2010) Role of secondary sensory cortices in emotional memory storage and retrieval in rats. Science 329:649-656.

Sadananda M, Wohr M, Schwarting RK (2008) Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. Neurosci Lett 435:17-23.

Sales GD (1972) Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. Anim Behav 20:88-100.

Sales, G.D. (2009). Ultrasound and mating behaviour in rodents with some observations on other behavioural situations. Journal of Zoology 168(2):149 - 164

Salinas E, Sejnowski TJ (2001) Correlated neuronal activity and the flow of neural information. Nat Rev Neurosci 2:539-550.

Sanders I, Weisz DJ, Yang BY, Fung K, Amirali A. (2001) The mechanism of ultrasonic vocalization in the rat, Soc Neurosci Abstr. 27: #88.19.

Sander D, Grafman J, Zalla T (2003) The human amygdala: an evolved system for relevance detection. Rev Neurosci 14:303-316.

Sauseng P, Klimesch W (2008) What does phase information of oscillatory brain activity tell us about cognitive processes? Neurosci Biobehav Rev 32:1001-1013.

Schafe GE, LeDoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. J Neurosci 20:RC96.

Shepherd GM, Greer CA (1990) Olfactory bulb. in The synaptic organization of the brain, ed Shepherd GM (Oxford UP, New York), pp 133–169.

Schnitzler A, Gross J (2005) Normal and pathological oscillatory communication in the brain. Nat Rev Neurosci 6:285-296.

Schoppa NE (2006) Synchronization of olfactory bulb mitral cells by precisely timed inhibitory inputs. Neuron 49:271-283.

Schultz W (2013) Updating dopamine reward signals. Curr Opin Neurobiol. 23(2): 229–238.

Schwabe L, Joels M, Roozendaal B, Wolf OT, Oitzl MS (2012) Stress effects on memory: an update and integration. Neurosci Biobehav Rev 36:1740-1749.

Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. Science. 301 (5634):846-50.

Sevelinges Y, Gervais R, Messaoudi B, Granjon L, Mouly AM (2004) Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. Learn Mem 11:761-769.

Sevelinges Y, Sullivan RM, Messaoudi B, Mouly AM (2008) Neonatal odor-shock conditioning alters the neural network involved in odor fear learning at adulthood. Learn Mem 15:649-656.

Shionoya K, Hegoburu C, Brown BL, Sullivan RM, Doyere V, Mouly AM (2013) It's time to fear! Interval timing in odor fear conditioning in rats. Front Behav Neurosci 7:128.

Shipley MT, Ennis M (1996) Functional organization of olfactory system. J Neurobiol 30:123-176.

Shuler MG, Bear MF (2006) Reward timing in the primary visual cortex. Science 311:1606-1609.

Simola N (2015) Rat Ultrasonic Vocalizations and Behavioral Neuropharmacology: From the Screening of Drugs to the Study of Disease. Curr Neuropharmacol 13:164-179.

Singer W, Gray CM (1995) Visual feature integration and the temporal correlation hypothesis. Annu Rev Neurosci 18:555-586.

Sirotin YB, Costa ME, Laplagne DA (2014) Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior. Front Behav Neurosci 8:399.

Skinner BF (1938) The behavior of organisms. An experimental analysis. New York: Appleton-Century-Crofts.

Spencer RMC, Ivry RB. (2013) Cerebellum and Timing. In Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders, pp. 1201–1219.

Spors H, Grinvald A (2002) Spatio-temporal dynamics of odor representations in the mammalian olfactory bulb. Neuron 34:301-315.

Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. Neurobiol Learn Mem 82:171-177.

Squire LR, Wixted JT (2011) The cognitive neuroscience of human memory since H.M. Annu Rev Neurosci 34:259-288.

Stujenske JM, Likhtik E, Topiwala MA, Gordon JA (2014) Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala. Neuron 83:919-933.

Sullivan RM, Landers M, Yeaman B, Wilson DA (2000) Good memories of bad events in infancy. Nature 407:38-39.

Suzuki N, Bekkers JM (2007) Inhibitory interneurons in the piriform cortex. Clin Exp Pharmacol Physiol 34:1064-1069.

Swanson LW, Petrovich GD (1998) What is the amygdala? Trends Neurosci, 21, 323-331.

Swee G, Schirmer A (2015) On the importance of being vocal: saying "ow" improves pain tolerance. J Pain 16:326-334.

T**Takahashi LK**, Nakashima BR, Hong H, Watanabe K (2005) The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. Neurosci Biobehav Rev 29:1157-1167.

Tallon-Baudry C, Bertrand O (1999) Oscillatory gamma activity in humans and its role in object representation. Trends Cogn Sci 3:151-162.

Tallon-Baudry C, Bertrand O, Fischer C (2001) Oscillatory synchrony between human extrastriate areas during visual short-term memory maintenance. J Neurosci 21:RC177.

Tam SK, Jennings DJ, Bonardi C (2015) Effects of dorsal hippocampal damage on conditioning and conditioned-response timing: A pooled analysis. Hippocampus. 25(4):444-59.

Taub AH, Perets R, Kahana E, Paz R (2018) Oscillations Synchronize Amygdala-to-Prefrontal Primate Circuits during Aversive Learning. Neuron 97:291-298 e293.

Tegoni M, Pelosi P, Vincent F, Spinelli S, Campanacci V, Grolli S, Ramoni R, Cambillau C (2000) Mammalian odorant binding proteins. Biochim Biophys Acta 1482:229-240.

Terral G, Busquets-Garcia A, Varilh M, Achicallende S, Cannich A, Bellocchio L, Bonilla-Del Rio I, Massa F, Puente N, Soria-Gomez E, Grandes P, Ferreira G, Marsicano G (2019) CB1 Receptors in the Anterior Piriform Cortex Control Odor Preference Memory. Curr Biol 29:2455-2464 e2455.

Thompson B, Leonard KC, Brudzynski SM (2006) Amphetamine-induced 50 kHz calls from rat nucleus accumbens: a quantitative mapping study and acoustic analysis. Behav Brain Res 168:64-73.

Thorndike E (1898) SOME EXPERIMENTS ON ANIMAL INTELLIGENCE. Science 7:818-824.

Tort AB, Komorowski R, Eichenbaum H, Kopell N (2010) Measuring phase-amplitude coupling between neuronal oscillations of different frequencies. J Neurophysiol. 104(2):1195-210.

Tort ABL, Ponsel S, Jessberger J, Yanovsky Y, Brankack J, Draguhn A (2018) Parallel detection of theta and respiration-coupled oscillations throughout the mouse brain. Sci Rep 8:6432.

Tort ABL, Brankack J, Draguhn A (2018) Respiration-Entrained Brain Rhythms Are Global but Often Overlooked. Trends Neurosci 41:186-197.

Tovote P, Esposito MS, Botta P, Chaudun F, Fadok JP, Markovic M, Wolff SB, Ramakrishnan C, Fenno L, Deisseroth K, Herry C, Arber S, Luthi A (2016) Midbrain circuits for defensive behaviour. Nature 534:206-212.

Tschida K, Michael V, Takatoh J, Han BX, Zhao S, Sakurai K, Mooney R, Wang F (2019) A Specialized Neural Circuit Gates Social Vocalizations in the Mouse. Neuron 103:459-472 e454.

Tulving E (1985) How many memory systems are there? American psychologist, 40, 385-398.

U

Uhlhaas PJ, Haenschel C, Nikolic D, Singer W (2008) The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia. Schizophr Bull 34:927-943.

V

Vanderwolf CH (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 26:407-418.

Varela F, Lachaux JP, Rodriguez E, Martinerie J (2001) The brainweb: phase synchronization and large-scale integration. Nat Rev Neurosci 2:229-239.

Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. Neuroscience 142:1-20.

Vivian JA, Miczek KA (1993) Morphine attenuates ultrasonic vocalization during agonistic encounters in adult male rats. Psychopharmacology (Berl) 111:367-375.

Vivian JA, Farrell WJ, Sapperstein SB, Miczek KA (1994) Diazepam withdrawal: effects of diazepam and gepirone on acoustic startle-induced 22 kHz ultrasonic vocalizations. Psychopharmacology (Berl) 114:101-108.

Voorn P, Vanderschuren LJ, Groenewegen HJ, Robbins TW, Pennartz CM (2004) Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. Trends Neurosci 27:468-474.

W

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

Walker DL, Paschall GY, Davis M (2005) Glutamate receptor antagonist infusions into the basolateral and medial amygdala reveal differential contributions to olfactory vs. context fear conditioning and expression. Learn Mem 12:120-129.

Watson JB, Rayner R (1920) Conditioned emotional reactions. Journal of Experimental Psychology, 3, 1-14.

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

Wetzel DM, Kelley DB, Campbell BA (1980) Central control of ultrasonic vocalizations in neonatal rats: I. Brain stem motor nuclei. J Comp Physiol Psychol 94:596-605.

Willuhn I, Tose A, Wanat MJ, Hart AS, Hollon NG, Phillips PE, Schwarting RK, Wohr M (2014) Phasic dopamine release in the nucleus accumbens in response to pro-social 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. J Neurosci 34:10616-10623.

Wilson DA (2003) Rapid, experience-induced enhancement in odorant discrimination by anterior piriform cortex neurons. J Neurophysiol 90:65-72.

Witter MP, Amaral DG (1991) Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. J Comp Neurol 307:437-459.

Wohr M, Borta A, Schwarting RK (2005) Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm: a dose-response study in the rat. Neurobiol Learn Mem 84:228-240.

Wohr M, Schwarting RK (2007) Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior? PLoS One 2:e1365.

Wohr M, Houx B, Schwarting RK, Spruijt B (2008) Effects of experience and context on 50-kHz vocalizations in rats. Physiol Behav 93:766-776.

Wohr M, Schwarting RK (2013) Affective communication in rodents: ultrasonic vocalizations as a tool for research on emotion and motivation. Cell Tissue Res 354:81-97.

X

Xu M, Zhang SY, Dan Y, Poo MM (2014) Representation of interval timing by temporally scalable firing patterns in rat prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 111:480-485.

Y

Yanovsky Y, Ciatipis M, Draguhn A, Tort AB, Brankack J (2014) Slow oscillations in the mouse hippocampus entrained by nasal respiration. J Neurosci 34:5949-5964.

Yeshurun Y, Sobel N (2010) An odor is not worth a thousand words: from multidimensional odors to unidimensional odor objects. Annu Rev Psychol 61:219-241, C211-215.

Yin B, Troger AB (2011) Exploring the 4th dimension: hippocampus, time, and memory revisited. Front Integr Neurosci 5:36.

Z**Zhong W**, Ciatipis M, Wolfenstetter T, Jessberger J, Muller C, Ponsel S, Yanovsky Y, Brankack J, Tort ABL, Draguhn A (2017) Selective entrainment of gamma subbands by different slow network oscillations. Proc Natl Acad Sci U S A 114:4519-4524.

Publications et conférences scientifiques

I. Publications en lien avec le travail de thèse

Dupin M, Garcia S, Boulanger-Bertolus J, Buonviso N, Mouly AM. New Insights from 22-kHz Ultrasonic Vocalizations to Characterize Fear Responses: Relationship with Respiration and Brain Oscillatory Dynamics. eNeuro. 2019 May 7;6(2). pii: ENEURO.0065-19.2019. doi: 10.1523/ENEURO.0065-19.2019.

Dupin M, Garcia S, Messaoudi B, Doyère V, Mouly AM. Neural network dynamics associated with interval timing in odor fear conditioning. In preparation

II. Présentations orales

Dupin M, Doyère V, Mouly. A-M. Encodage du temps dans la formation des mémoires émotionnelles chez le rat : du comportement aux réseaux neuronaux, GDR Mémoire, 2017, Porquerolles.

III. Présentations affichées

Dupin M, Mouly AM. Impact of 22-kHz ultrasonic vocalizations on oscillatory activities in the neural network underlying fear expression in rats, *European Brain and Behavior Society*, Septembre 2017, Bilbao, Espagne.

Dupin M, Garcia S, Mouly AM. Impact of 22-kHz ultrasonic vocalizations on oscillatory activities in the neural network underlying fear expression in rats, *Federation of European Neuroscience Societies*, Juillet 2018, Berlin, Allemagne.

Dupin M, Garcia S, Mouly AM. Impact of 22-kHz ultrasonic vocalizations on oscillatory activities in the neural network underlying fear expression in rats, *GDR NeuralNet*, Décembre 2018, Paris, France.

Dupin M, Garcia S, Boulanger-Bertolus J, Buonviso N, Mouly AM. New Insights from 22-kHz Ultrasonic Vocalizations to Characterize Fear Responses: Relationship with Respiration and Brain Oscillatory Dynamics, *European Brain and Behavior Society*, Septembre 2019, Paris, France.

Dupin M, Garcia S, Boulanger-Bertolus J, Buonviso N, Mouly AM. New Insights from 22-kHz Ultrasonic Vocalizations to Characterize Fear Responses: Relationship with Respiration and Brain Oscillatory Dynamics, *GDR NeuralNet*, Décembre 2019 (à venir), Bordeaux, France.

Annexe 1 - Highlight research paper

Cognition and Behavior

Highlighted Research Paper: New Insights from 22-kHz Ultrasonic Vocalizations to Characterize Fear Responses: Relationship with Respiration and Brain Oscillatory Dynamics, by Maryne Dupin, Samuel Garcia, Julie Boulanger-Bertolus, Nathalie Buonviso, and Anne-Marie Mouly

Ultrasonic Vocalizations Emitted during Defensive Behavior Alter the Influence of the Respiratory Rhythm on Brain Oscillatory Dynamics in the Fear Circuit of Rats

Rosalind S.E. Carney, DPhil

Vocalization by animals enables intraspecies communication about dynamic environmental conditions, such as the presence of predators, food availability or scarcity, and also facilitates nurturing interactions from mother to offspring. Vocalizations conform to the auditory range of each species and can vary with age (Portfors, 2007). For example, rat pups emit 40-kHz ultrasonic vocalizations (USVs) when they are separated from their mothers, and these oscillations have been used as an indicator of distress in studies examining the effects of maternal neglect (Simola, 2015; Courtiol et al., 2018). Adult rats emit either 22-kHz or 50-kHz USVs, which reflect negative and positive emotional states, respectively (Portfors, 2007). Rats emit 22-kHz USVs when they are exposed to aversive stimuli, such as foot shocks (Wöhr et al., 2005), which serve as an unconditioned stimulus in fear conditioning experiments. Inaudible to humans, 22-kHz USVs can be recorded and used as an indicator of emotional status in combination with overt fear responses such as escape or freezing (absence of body movement excluding respiration) behaviors. As opposed to escape, freezing is a passive response and is frequently used as an indicator of fear during animal experimentation.

Freezing behavior alters brain oscillations; the onset and offset of freezing is temporally related to sustained 4-Hz oscillations in the medial prefrontal cortex–basolateral amygdala (mPFC–BLA) circuitry (Dejean et al., 2016; Karalis et al., 2016). These oscillations are distinct from the theta (4–12 Hz) and gamma (30–120 Hz) synchronized oscillations in mPFC–BLA circuitry that occur during the memory consolidation and retrieval components of fear expression (Seidenbecher et al., 2003; Popa et al., 2010; Headley and Paré, 2013; Herry and Johansen, 2014; Likhtik et al., 2014; Stujenske et al., 2014; Bocchio et al., 2017). Synchronized oscillations are thought to facilitate coordination of activities between neuronal populations and can be influenced by an animal's respiratory rate (Heck et al., 2017; Tort et al., 2018). As 22-kHz USVs are produced during exhalation and decrease the respiratory rate (Frysztak and Neafsey, 1991; Hegoburu et al., 2011; Sirotin et al., 2014; Boulanger-Bertolus et al., 2017), they can also affect oscillatory patterns in the brain. An understanding of the interplay of USV production, freezing behavior, and respiration on brain oscillatory dynamics—which could have an impact on the interpretation of fear expression parameters—was lacking. In their *eNeuro* publication, Dupin et al. (2019) investigated how USV production by a rat alters brain oscillations in its fear expression circuit and how these changes relate to the rat's respiratory cycle.

The experimental approach required simultaneous recording of changes in respiration and brain oscillations and recording of 22-kHz USVs in adult rats. This was facilitated by the use of a customized whole-body plethysmograph, an instrument used to record pressure changes due to an animal's respiration, which was described in a previous study (Hegoburu et al., 2011). In addition to measuring respiration, the customized chamber contains a microphone and video cameras to facilitate recording USV production and body movements, respectively. To enable a fear conditioning paradigm, in which rats learn to associate an odor with a foot shock, the chamber also has an electrified floor and tubing in the ceiling of the chamber through which odors can be dispensed.

Adult rats underwent a surgical procedure to implant local field potential (LFP) wireless recording electrodes in three locations in the left hemisphere of the brain: BLA,

Received July 12, 2019; accepted July 22, 2019; First published September 10, 2019.
https://doi.org/10.1523/ENEURO.0280-19.2019

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

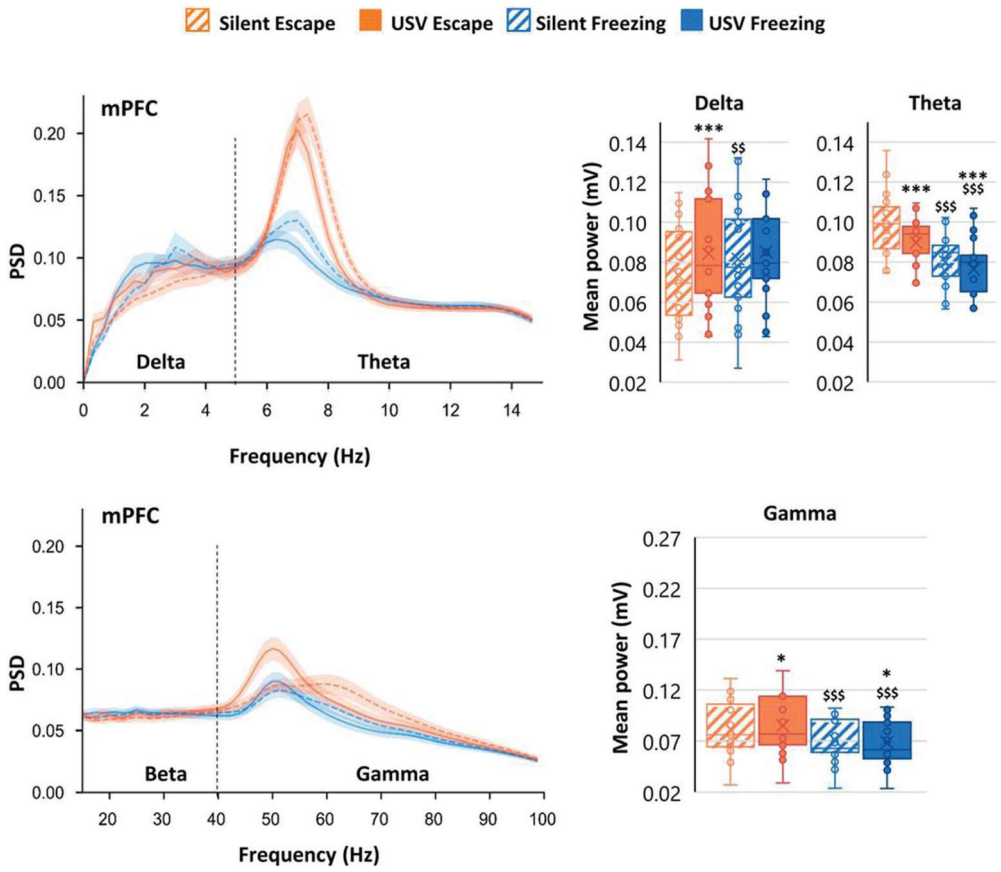


Figure 1. PSD of mPFC LFP signals and mean power in delta (0–5 Hz), theta (5–15 Hz), and gamma (40–80 Hz) bands. The average PSD (±SEM) is represented on the left, and the delta, theta, and gamma average power (±SEM) is represented on the right. $*p < 5 \times 10^{-2}$, $**p < 5 \times 10^{-3}$, $***p < 5 \times 10^{-4}$: significant difference between same color-different pattern bars; $\$p < 5 \times 10^{-2}$, $\$\$p < 5 \times 10^{-3}$, $\$\$\$p < 5 \times 10^{-4}$: significant difference between same pattern-different color bars. (Adapted from Figure 3 & Figure 4 in Dupin et al., 2019).

mPFC, and the piriform olfactory cortex (PIR); the PIR is involved in odor fear conditioning. A 2 week recovery period was followed by 4 d of brief (30 min) acclimatization to the customized chamber. During fear conditioning, each rat was placed in the chamber for 4 min before the onset of the first of 10 odor-shock trials that were separated by 4 min intertrial intervals. In each trial, an odor was dispensed into the cage for 20 s, and a foot shock was delivered during the last second of each trial. In the minute after the foot shock, the rats exhibited either freezing or escape behavior. As expected, rats emitted USVs while exhibiting freezing behavior. An unexpected finding was that USVs were also emitted during escape behavior, albeit to a lesser extent than during freezing behavior. This led the authors to further define the 1-min period of post-foot shock behavior into four categories: USV freezing, silent freezing, USV escape, and silent escape. USVs emitted during escape were louder and of shorter duration than the USVs emitted during freezing.

Fear retention was tested 48 h after fear conditioning. Each rat was placed in the customized chamber that now contained new visual cues and a plastic floor to eliminate contextual fear. After 4 min of acclimatization, the odor was presented for 20 s, for a total of five times, separated by 4 min intertrial intervals. Defensive behavior during the 20 s odor presentation period was measured and averaged over the trials. This analysis revealed that the amount of USV freezing during fear conditioning was positively correlated with the amount of USV freezing during the fear retention test. No such relationship was found for escape behavior. The observations thus far showed that rats emit USVs of different duration and amplitude during passive or active defensive behaviors. Only USVs emitted during freezing were predictive of the fear response during retention testing when the original unconditioned stimulus was no longer present.

Brain oscillatory dynamics in the BLA, mPFC, and PIR during the 1-min post-foot shock period during fear conditioning were temporally related to periods of USV calls; individual USVs were of too short a duration to permit individual USVs to be directly linked to neural activity. Power spectral density (PSD) is the time-frequency representation in which mean power signals are separated into delta (0–5 Hz), theta (5–15 Hz), beta (15–40 Hz), and gamma (40–80 Hz) frequencies. Compared with silent periods in which no USVs were emitted, periods of USV vocalization, during either freezing or escape behavior, coincided in increases in delta, beta (in PIR), and gamma

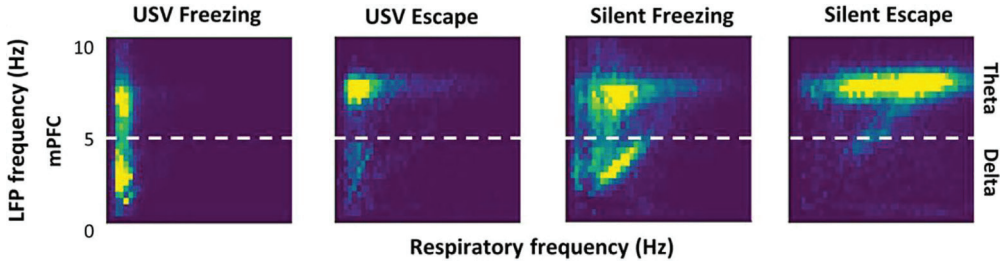


Figure 2. Covariation between delta and theta oscillatory frequencies and respiratory frequency. 2D matrix histograms obtained from LFP signals recorded in mPFC; *y*-axis represents LFP frequency and *x*-axis represents respiratory frequency. The 2D histogram is normalized so that the total sum is 1, and point density is represented on a color scale ranging from blue to yellow as the point density increases. (Adapted from Figure 6 in Dupin et al., 2019).

oscillations, and a decrease in theta oscillations in all recorded regions (Fig. 1). These results show that USV production affects oscillatory dynamics in the fear expression circuit.

Brain oscillatory changes were next related to changes in respiration parameters. First, USV emission uncoupled the relationship, which was present during silent freezing, between delta frequency in the recorded brain regions and the respiratory frequency (Fig. 2). Second, USV emission induced a reorganization of beta and gamma activity power during the respiratory cycle, with increased beta power during the first half of expiration phase, and increased gamma power during the second half of expiration (Fig. 3). These results show that some of the effects of USV emission on brain oscillatory dynamics are mediated by its modulation of respiratory signal.

This *eNeuro* publication by Dupin et al. (2019) includes several findings applicable to various disciplines of neuroscience. The authors show that USVs are emitted during escape behavior. Whereas USV production during locomotion had been previously described (Laplagne and Elías Costa, 2016; Boulanger-Bertolus et al., 2017), the results of the current study suggest that USV production cannot be wholly associated with the passive defensive behavior of freezing—USV production occurs to a small extent during the active defensive behavior of escape. The authors also show that USV emission and defensive behavior can modulate the various oscillatory dynamics of the brain fear circuit, in part, by influencing the respiratory cycle. These observations suggest that different manners of fear expression can contribute to respiration-induced alterations in brain oscillations, and in turn, cognitive func-

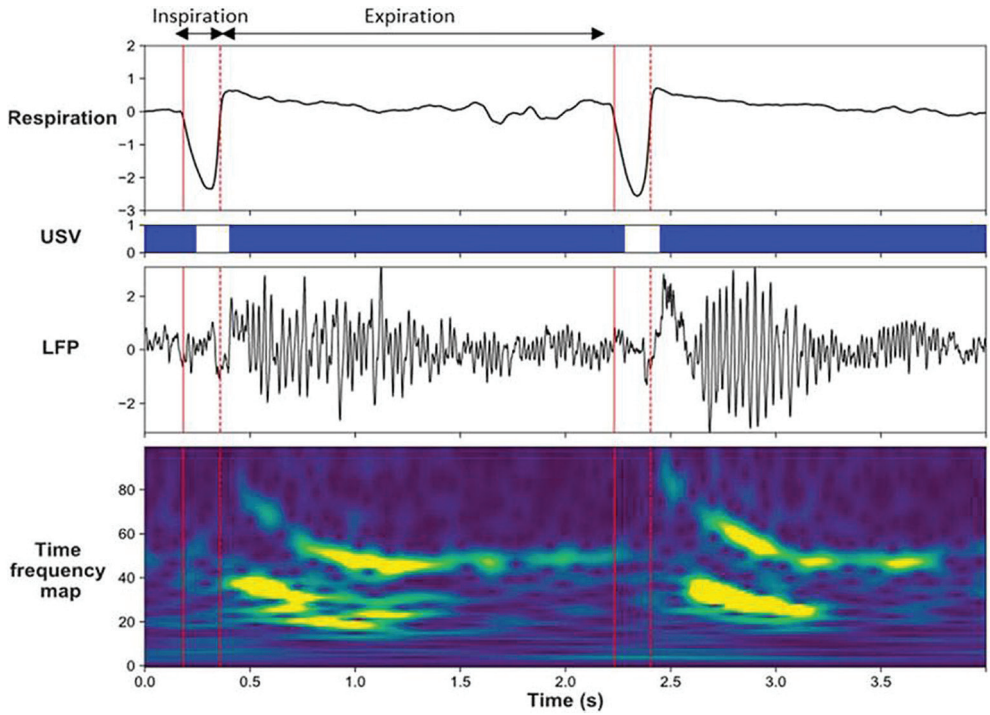


Figure 3. Modulation of beta and gamma power by the phase of the respiratory cycle. Individual traces representing from the top, respiratory signal, USV calls, raw LFP signal recorded in the PIR and its time frequency map (*y*-axis, LFP signal frequency in Hz; *x*-axis, time in milliseconds). (Adapted from visual abstract in Dupin et al., 2019).

tion. The authors hypothesize that USV-induced alterations of synchronous neural activity in fear circuitry could reinforce the strength of fear memories. Future studies in Dr. Mouly's laboratory (Lyon Neuroscience Research Center, INSERM U1028, Lyon, France) will investigate whether fear memory is altered when certain brain structures involved in USV production are inactivated. A better understanding of the impact of USV production on brain neural dynamics is particularly relevant for rodent models of human neurodevelopmental disorders for which socio-affective communication is severely impaired, such as autism spectrum disorder (Wöhr and Scattoni, 2013).

References

Bocchio M, Nabavi S, Capogna M (2017) Synaptic plasticity, engrams, and network oscillations in amygdala circuits for storage and retrieval of emotional memories. Neuron 94:731–743.

Boulanger-Bertolus J, Rincón-Cortés M, Sullivan RM, Mouly AM (2017) Understanding pup affective state through ethologically significant ultrasonic vocalization frequency. Sci Rep 7:13483.

Courtiol E, Wilson DA, Shah R, Sullivan RM, Teixeira CM (2018) Maternal regulation of pups' cortical activity: role of serotonergic signaling. eNeuro 4:ENEURO.0093-18.2018.

Dejean C, Courtin J, Karalis N, Chaudun F, Wurtz H, Bienvenu TC, Herry C (2016) Prefrontal neuronal assemblies temporally control fear behaviour. Nature 535:420–424.

Dupin M, Garcia S, Boulanger-Bertolus J, Buonviso N, Mouly AM (2019) New insights from 22-kHz ultrasonic vocalizations to characterize fear responses: relationship with respiration and brain oscillatory dynamics. eNeuro 6:ENEURO.0065-19.2019.

Frysztak RJ, Neafsey EJ (1991) The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, "freezing," and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. Cereb Cortex 1:418–425.

Headley DB, Paré D (2013) In sync: gamma oscillations and emotional memory. Front Behav Neurosci 7:170.

Heck DH, McAfee SS, Liu Y, Babajani-Feremi A, Rezaie R, Freeman WJ, Wheless JW, Papanicolaou AC, Ruszinkó M, Sokolov Y, Kozma R (2017) Breathing as a fundamental rhythm of brain function. Front Neural Circuits 10:115.

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

Herry C, Johansen JP (2014) Encoding of fear learning and memory in distributed neuronal circuits. Nat Neurosci 17:1644–1654.

Karalis N, Dejean C, Chaudun F, Khoder S, Rozeske RR, Wurtz H, Bagur S, Benchenane K, Sirota A, Courtin J, Herry C (2016) 4-Hz oscillations synchronize prefrontal-amygdala circuits during fear behavior. Nat Neurosci 19:605–612.

Laplagne DA, Elías Costa M (2016) Rats synchronize locomotion with ultrasonic vocalizations at the subsecond time scale. Front Behav Neurosci 10:184.

Likhtik E, Stujenske JM, Topiwala MA, Harris AZ, Gordon JA (2014) Prefrontal entrainment of amygdala activity signals safety in learned fear and innate anxiety. Nat Neurosci 17:106–113.

Popa D, Duvarci S, Popescu AT, Léna C, Paré D (2010) Coherent amygdalocortical theta promotes fear memory consolidation during paradoxical sleep. Proc Natl Acad Sci USA 107:6516–6519.

Portfors CV (2007) Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. J Am Assoc Lab Anim Sci 46:28–34.

Seidenbecher T, Laxmi TR, Stork O, Pape HC (2003) Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. Science 301:846–850.

Simola N (2015) Rat ultrasonic vocalizations and behavioral neuropharmacology: from the screening of drugs to the study of disease. Curr Neuropharmacol 13:164–179.

Sirotin YB, Costa ME, Laplagne DA (2014) Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior. Front Behav Neurosci 8:399.

Stujenske JM, Likhtik E, Topiwala MA, Gordon JA (2014) Fear and safety engage competing patterns of theta-gamma coupling in the basolateral amygdala. Neuron 83:919–933.

Tort ABL, Brankačk J, Draguhn A (2018) Respiration-entrained brain rhythms are global but often overlooked. Trends Neurosci 41:186–197.

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

Wöhr M, Scattoni ML (2013) Behavioural methods used in rodent models of autism spectrum disorders: current standards and new developments. Behav Brain Res 251:5–17.

Annexe 2 - Research Article Summary (Sfn Journals)

What Happens to Neural Dynamics When a Rat Emits Ultrasonic Vocalizations?

Material below summarizes the article New Insights from 22-kHz Ultrasonic Vocalizations to Characterize Fear Responses: Relationship with Respiration and Brain Oscillatory Dynamics*, published on April 8, 2019, in* eNeuro *and authored by Maryne Dupin, Samuel Garcia, Julie Boulanger-Bertolus, Nathalie Buonviso, and Anne-Marie Mouly.*

Highlights

- Rats produce ultrasonic vocalizations when faced with a danger or an aversive event causing oscillatory activities supporting fear and behavior in the neural network to be modified.
- Ultrasonic vocalizations are accompanied by a slowing of respiratory rhythm, and a loss of frequency coupling between breathing and brain slow oscillatory activity.
- Ultrasonic vocalizations may result in a differential gating of information within the fear-related network, and modulate fear expression and memory.

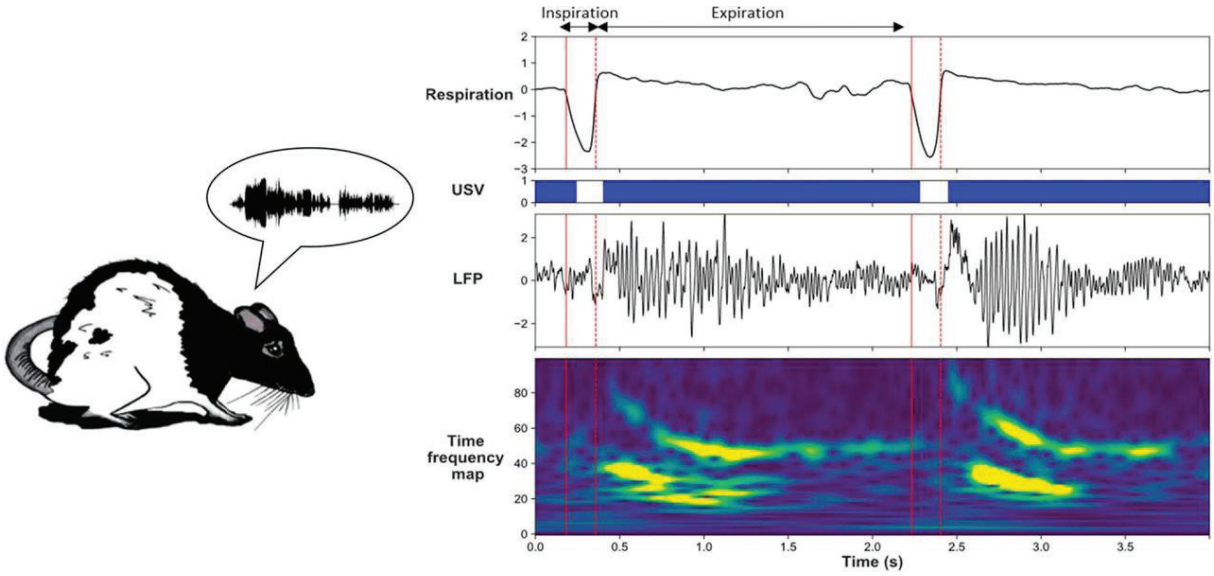


Figure 1. During USV, oscillatory activities in the neural network supporting fear behavior are strongly modified. These changes are accompanied by a loss of frequency coupling between breathing rhythm and brain slow oscillatory activity. These data suggest USV emission may trigger a differential gating of information within the fear neural network, thus potentially modulating fear expression and/or memory. *(Visual abstract from Dupin et al. 2019.)*

Study Question

What happens to our brain when we scream? We addressed this question in rats that emit ultrasonic vocalizations when confronted with an aversive or frightening event.

How This Research Advances What We Know

When you hit your toe against the corner of your bed, you feel a sharp pain that may make you scream or swear. In the same way, you may become startled and scream when a barking dog suddenly jumps up from behind a fence next to you.

Vocalizing when exposed to the stimulation of a frightening event is highly conserved throughout the animal kingdom. For instance, when a rat faces a danger, like an encounter with a predator or an aggressive conspecific, it vocalizes in the audible range and in the ultrasonic range (22kHz). These ultrasonic vocalizations reflect a negative emotional state and belong to the rat's fear response repertoire.

Fear behavior depends on interactions between the medial prefrontal cortex (mPFC) and the basolateral amygdala (BLA), and involves synchronized activity in theta and gamma oscillatory activities in these brain areas.

In addition, freezing in place, the most classical measure of fear response in rodents, temporally coincides with the development of sustained 4-Hz oscillations in prefrontal-amygdala circuits. Recent studies have shown these oscillations depend on the animal's respiratory rate, supporting the growing body of evidence pinpointing the influence of nasal breathing on brain rhythms.

Importantly, the animal's breathing rhythm drastically slows during 22-kHz ultrasonic vocalizations, potentially disrupting the respiratory-related brain rhythm described above.

The aim of our study was two-fold: first, to investigate whether ultrasonic vocalizations induce specific changes in oscillatory activities in the fear neural network of the vocalizing animal, and second, to assess to what extent these changes are related to changes in breathing rhythm.

Experimental Design or Methodology

To address these questions, we trained rats in a fear conditioning paradigm, in which a given stimulus (an odor) signaled the arrival of a foot-shock a few seconds later. Fear conditioning is a widely used task in the literature of fear memories in animals, and this paradigm readily induces ultrasonic vocalizations in rats.

Using wireless electrophysiological recording, we monitored local field potentials (reflecting the activity of populations of neurons) simultaneously in BLA, mPFC, and olfactory cortex in

rats engaged in odor fear conditioning. Training was conducted in an experimental cage allowing monitoring of ultrasonic vocalizations, overt behavior, and respiration.

Signal analysis focused on the one-minute period following foot-shock delivery, during which a high number of ultrasonic vocalizations are typically observed. We first calculated brain oscillatory activity power in the different frequency bands during sequences of ultrasonic calls and compared it to sequences without ultrasonic vocalizations (silent sequences). We showed during ultrasonic vocalizations, activity power in delta (0–5Hz), beta (15–40Hz), and gamma (40–80Hz) bands increases in the recorded network, while theta (5–15Hz) activity power decreases.

We then assessed whether the frequency of oscillatory activity in the delta and theta range follows breathing frequency (which can vary from 0.5–10 Hz), and if it does, whether ultrasonic vocalizations emission disrupts this coordination. We showed during silent sequences, breathing rhythm is coupled with delta oscillatory activity in the recorded network. This coupling fades away during ultrasonic vocalizations.

We finally assessed whether activity in the beta and gamma bands is modulated by the phase of the respiratory cycle (inhalation versus exhalation) during silent sequences, and whether ultrasonic vocalizations have an impact on this modulation. We showed beta and gamma activity power is strongly modulated by the phase of the respiratory cycle during silent sequences, and the emission of ultrasonic vocalizations is associated with drastic changes in the time course of this modulation.

Results

What could be the adaptive value for an organism to vocalize when feeling sudden pain or fear? Screams of fear in humans contain much higher levels of roughness than normal sounds and activate the fear circuitry of the brain of listeners. Rats' ultrasonic vocalizations have similar consequences and have been suggested to play the role of alarm calls to warn conspecifics about external danger. Thus, screaming in humans, akin to ultrasonic calls in rats, may serve to increase alertness and convey danger to conspecifics.

Screaming may also have an adaptive value for the individual doing the screaming. In humans, a recent study in which subjects were asked to immerse their hands in painfully cold water showed the subjects were able to tolerate the pain longer when they were allowed to vocalize their suffering. Thus, screaming might be a way to attenuate pain, which could be achieved through a competition between sound production pathways and pain-related neural processes.

Our data suggest that rats' 22-kHz ultrasonic vocalizations may result in a differential gating of information within the fear-related network. Just as screaming can attenuate pain, ultrasonic vocalizations might interfere with the formation or expression of fear memories. In line with this idea, we showed the amount of ultrasonic vocalizations during training was a good predictor of the animals' learned fear response measured 24h later: The more ultrasonic vocalizations at training, the better the learned fear response.

Interpretation

We propose that ultrasonic vocalizations and their particular respiratory pattern associated with a specific combination of brain oscillatory activities, might enhance plasticity in brain structures of the fear network and ultimately strengthen fear memories. Additional experiments are needed to explore the causal link between ultrasonic vocalizations-related changes in oscillatory activities and fear memory.

Our work provides new insights on how social vocalizations and respiratory rhythm collectively influence coordinated brain activity during defensive and emotional states. A better knowledge of the impact of 22-kHz ultrasonic vocalizations on brain neural dynamics is also particularly relevant for rodent models of human neuropsychiatric disorders, for which socio-affective communication is severely impaired.

In addition, the present finding that respiration changes induced by ultrasonic vocalizations relay some of the observed correlates on brain oscillations adds novel and original information on the role of nasal breathing in the orchestration of brain rhythms.

Annexe 3 – Table des illustrations

Introduction générale

Chapitre 1

Figure 1 : Illustration par Martin Singer tirée du blog Better Than Life 23
Figure 2: Courbe de l'oubli d'Ebbinghaus 25
Figure 3 : Tâche de suivi de l'étoile à 5 branches à travers le miroir..... 27
Figure 4 : Les différents systèmes mnésiques et les structures clés impliquées..... 28
Figure 5 : Schéma du dispositif expérimental de la boîte de Skinner..... 30
Figure 6 : Schéma du dispositif expérimental de l'expérience de conditionnement associatif appétitif de Pavlov 31
Figure 7 : Dispositif expérimental du conditionnement associatif chez les plantes..... 32
Figure 8 : L'expression des émotions chez l'Homme et les animaux (1872) par Charles Darwin 33
Figure 9 : La roue des émotions selon Plutchik 34
Figure 10 : Posture de freezing chez le rat..... 36
Figure 11 : Posture de fuite chez le rat 36
Figure 12 : La fuite face au prédateur..... 37
Figure 13 : Posture de combat chez le rat 37
Figure 14 : Schéma des principales structures impliquées dans les différents types de réponses de défense, en aval du noyau central de l'amygdale.. 38
Figure 15 : Les effets du stress sur l'organisme. 39
Figure 16 : Photographies de l'expérience sur le petit Albert. 40

Chapitre 2

Figure 17 : Organisation générale du système olfactif du rat 46
Figure 18 : Trajet de l'information olfactive 46
Figure 19 : Organisation de la muqueuse olfactive du rongeur 47
Figure 20 : Organisation du bulbe olfactif du rongeur. 49
Figure 21 : Organisation du cortex piriforme..... 50
Figure 22 : Schéma illustrant les principales connections du système olfactif principal 52
Figure 23 : Extrait d'une planche de l'album Astérix et les Normands décrivant le syndrome d'Urbach-Wiethe dont souffre la patiente S.M. 52
Figure 24 : Image cérébrales de cerveaux en coupe transversale (vue de dessus). A gauche, un cerveau sain. A droite le cerveau de la patiente S.M., présentant deux lésions bilatérales au niveau des amygdales (en rouge). 53
Figure 25 : Organisation du complexe amygdalien du rongeur..... 54
Figure 26 : Réseau neuronal sous-tendant le conditionnement de peur au son. 57

Chapitre 3

Figure 27 : Chronologie de la découverte des oscillations. 64
Figure 28 : Synchronisation locale et distale des populations neuronales..... 65
Figure 29: Classification des oscillations chez le rongeur. 66
Figure 30 : Le potentiel de champ local. 67
Figure 31 : Résumé des méthodes de traitement du signal. 68
Figure 32 : Modulation des activités oscillatoires du bulbe olfactif par la respiration.. 70
Figure 33 : La respiration nasale entraîne les rythmes cérébraux des régions cérébrales olfactives et non olfactives. 72
Figure 34 : Les oscillations au sein du réseau hippocampe (CA1)-cortex préfrontal (mPFC)-amygdale(BLA). 75

Travail expérimental

Introduction aux vocalisations ultrasonores et activités oscillatoires

Figure 35 : Exemple d'enregistrement au cours d'une séance de conditionnement..... 83
Figure 36 : Coupe sagittale des voies respiratoires supérieures du rat..... 84
Figure 37 : Modification de la pression sous- et sup-glottale engendrée par les vibrations des cordes vocales. 84
Figure 38 : Lien entre respiration et USV. 86
Figure 39 : Classification des USV du rat adulte selon Brudzynski (2013). 90
Figure 40 : Section para-sagittale d'un cerveau de rat montrant les systèmes cholinergique (rouge) et dopaminergique (bleu) contrôlant l'émission de vocalisations de 22 et 50 kHz respectivement. 92

Introduction à la perception du temps et des durées

Figure 41 : Représentation schématique de la notion d'intervalle de temps dans un conditionnement de peur à l'odeur. 125
Figure 42 : La perception temporelle à travers différentes échelles de temps..... 127
Figure 43 : Décours temporel d'un comportement suivant la propriété scalaire. 129
Figure 44 : Exemple de courbe obtenue dans une tâche de bissection temporelle. 130
Figure 45 : Schéma explicatif du modèle Striatal Beat Frequency (SBF). 135

Discussion générale et perpectives

Figure 46 : Décours temporel des USV au cours deux intervalles de temps différents. 175
Figure 47 : Décours temporel de la réponse de freezing au cours de deux intervalles de temps différents 176
Figure 48 : Décours temporel de la fréquence respiratoire au cours d'un intervalle de 20s pour des stimuli différents 177
Figure 49 : Evolution de l'indice de suppression conditionné (±sem) selon la durée de l'intervalle. 178
Figure 50 : Superposition du décours temporel de la respiration et de la puissance dans la bande fréquence thêta au cours de l'intervalle odeur-choc de 30s..... 182
Figure 51 : Schéma explicatif de la technique pharmacogénétique DREADD. 183
Figure 52 : Influence du CNO sur le conditionnement de peur 184

Portraits

Portrait 1 : Platon (428-348 avant notre ère) 24
Portrait 2 : René Descartes (1596-1650) 24
Portrait 3 : Edouard Claparède (1873-1940) 25
Portrait 4 : Henry Gustav Molaison (1929-2008)..... 26
Portrait 5 : Brenda Milner (1918) 26
Portrait 6 : A gauche, Edward Thorndike (1874-1949); à droite, Burrhus Frederic Skinner (1904-1990) 29
Portrait 7 : Ivan Pavlov (1849-1936) 30
Portrait 8 : Charles Darwin (1809-1882) 33
Portrait 9 : Donald Hebb 65