



HAL
open science

Impacts d'une perturbation de la voie TSC2/mTOR dans l'amygdale dès l'adolescence sur le comportement de peur et la fonctionnalité du cortex préfrontal chez le rat adulte

Fanny Joly

► **To cite this version:**

Fanny Joly. Impacts d'une perturbation de la voie TSC2/mTOR dans l'amygdale dès l'adolescence sur le comportement de peur et la fonctionnalité du cortex préfrontal chez le rat adulte. Neurosciences. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL016 . tel-03593404

HAL Id: tel-03593404

<https://theses.hal.science/tel-03593404v1>

Submitted on 2 Mar 2022

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.

Impacts d'une perturbation de la voie TSC2/mTOR
dans l'amygdale dès l'adolescence sur le
comportement de peur et la fonctionnalité du cortex
préfrontal chez le rat adulte

*Impacts of a TSC2/mTOR disruption in the amygdala
from adolescence on fear behavior and prefrontal
cortex functionality in adult rat*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°568 Signalisation et Réseaux Intégratifs en Biologie (BIOSIGNE)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Neurosciences Paris-
Saclay, 91190, Gif-sur-Yvette, France
Réfèrent : Faculté de Médecine du Kremlin Bicêtre

Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 01/03/2021, par

Fanny JOLY

Composition du Jury

Philippe FOSSATI

Professeur des universités, praticien hospitalier, ICM

Président

Guillaume FERREIRA

Directeur de recherche, HDR, Université de Bordeaux, INRA

Rapporteur

Thérèse JAY

Directrice de recherche émérite, HDR, Affiliation

Rapporteur & Examinatrice

Stéphanie DAUMAS

Maitre de conférences des universités, HDR, IBPS, INSERM

Examinatrice

Alain GARDIER

Professeur, Université de pharmacie, INSERM

Examineur

Direction de la thèse

Valérie DOYERE

Directrice de recherche, HDR, Institut Neuro-PSI, CNRS

Directrice de thèse

Cyrille VAILLEND

Directeur de recherche, HDR, Institut Neuro-PSI, CNRS

Co-Directeur de thèse

Remerciements

Je tenais à adresser mes remerciements à tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidée, soutenue et suivie à l'élaboration de cette thèse.

Tout d'abord, je remercie chaleureusement Valérie Doyère et Nicole El Massioui de m'avoir accueillie dans leur équipe dans le cadre de mon Master 2. Merci à Nicole, de m'avoir encadrée au cours de mon stage et suivie tout au long de ma thèse. Merci pour ta pédagogie, et pour toutes les connaissances que tu m'as apporté au cours de ces dernières années. Je remercie Valérie Doyère pour m'avoir encadrée tout au long de ma thèse, merci pour ta présence quotidienne et pour la rigueur scientifique, la ténacité, et l'intérêt pour la recherche que tu as su me transmettre. J'ai énormément appris au cours de ces quatre ans au travers de nos nombreuses discussions et « team meeting » qui maintiennent la cohésion de l'équipe et que j'apprécie. Merci à Cyrille Vaillend de m'avoir co-dirigée, pour les discussions scientifiques, toujours agréables. Pour les conseils que tu as toujours apporté à chacune de nos réunions et pour tes encouragements.

Merci également à Heather d'avoir rejoint notre équipe et de prendre la suite du projet. Merci de t'être intéressée à cette étude, mais aussi à la gentillesse dont tu fais toujours part, à ta pédagogie, ta patience et ton enthousiasme pour la recherche. J'espère que tu « t'éclateras » avec ce projet !

J'adresse également mes sincères remerciements aux membres du jury, Thérèse Jay, Guillaume Ferreira, Philippe Fossati, Stéphanie Dumas et Alain Gardier, de s'être intéressés à mon sujet et d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et ma soutenance.

Je remercie Stéphanie Dumas et Fawzi Boumezbeur, respectivement experte externe et rapporteur de mon comité de suivi de thèse. Au cours de ses trois ans, nos rencontres ont toujours été un plaisir grâce à l'enthousiasme et l'intérêt fort que vous avez porté à mon sujet, accompagné systématiquement de précieux conseils et encouragements qui m'ont toujours fait du baume au cœur et donné une impulsion supplémentaire quant à ma motivation à aborder une nouvelle année de thèse. En espérant sincèrement que nous restions en contact dans les prochaines années, votre amicalité ressentie à chacune de nos réunions résonneront encore et je vous en remercie sincèrement

Je remercie du fond du cœur et avec beaucoup d'amour mes deux co-thésardes préférées, Sloane et Lisa, sans qui rien n'aurait été pareil. Quasiment aucun jour ne passait sans que nous essayions de nous regrouper toutes les trois, dans des instants presque ritualisés. Merci pour les rires, pour les innombrables cafés, pour les discussions, pour l'entraide, pour les soirées festives, pour les motivations sportives. Pour les séjours à Marseille et à Prague, où j'en garde de merveilleux souvenirs. On aurait pu être des collègues, nous sommes surtout devenues amies. Merci pour chaque jour passés à vos côtés, dans les meilleurs moments mais aussi en cas de coup de mou. Partir sans vous risque d'être sans doute très difficile !

Je tenais également à remercier toutes les personnes de l'institut qui m'ont aidée, appuyée, soutenue au cours de cette thèse. Merci aux chercheurs, Jean-Marc, Roseline, Alexis, Sylvie, pour votre présence en cas de besoins et de conseils, pour nos discussions (scientifiques ou non !), pour l'organisation et le maintien des animations scientifiques qui donnent une vie à l'institut et les conseils que vous m'avez apporté au cours de ces quatre dernières années. Merci à Nathalie, Bernadette, Cécile, Vincent et Bruno pour votre immense aide pendant les périodes les plus intenses, pour nos discussions et nos rires, pour les pauses café. Vous avez systématiquement été agréables et chaleureux avec moi, et vous avez toujours su m'apporter de l'aide en cas de besoin. Je remercie également Véronique Rousseau pour m'avoir appris avec patience (et à plusieurs reprises !) les expériences de western blot, pour ta présence au cours de ces expériences, pour tes conseils et pour ton implication dans la réussite de ce projet.

I address a special thanks to Luke Johnson for welcoming me for 4 weeks in your lab and your place. Thanks to you and Sanket Raut for your daily availability, your exceptional enthusiasm, to helped and guided me every day, to our precious conversations and to let me discover this incredible and wonderful Tasmanian island. Thanks to Luke to taught me microanatomy analysis that passionate me and still do. Thanks for your encouragements which have been a precious help in this time. This journey has been an incredible professional experience, but certainly has been the best experience in my life so far. I promised, I will come back!

I also thank Hansjürgen Volkmer who helped me every time I needed during this thesis. For being nice and patient for every question I had, and for your involvement and the interest in my results.

Je souhaite également remercier les doctorants de l'institut avec qui j'ai toujours passé de bons moments. Au cours de l'ère pré-covid, nos réunions hebdomadaires, nos évènements festifs, nos discussions, vos conseils, et à notre incroyable équipe organisatrice du saint-barbecue de Neuro-PSI, j'ai toujours passé de bons moments, et je me suis toujours sentie incluse dans notre groupe.

Enfin, je remercie avec chaleur et un grand amour ma famille et mes amis qui, de près ou de loin, m'ont quotidiennement apporté leur soutien et leurs encouragements, vous étiez avec moi à chaque instant. Merci à ma mère, Patrick et mes frères, mais aussi à Camille, car même si tu n'es encore qu'un tout petit, ton apparition dans ma vie m'a apporté une joie indescriptible.

Merci à Nico, car sans ta présence et ton implacable soutien quotidien je n'en serais certainement pas là aujourd'hui. Merci de m'avoir supportée pendant cette thèse (et même avant !), pour le soutien dont tu as fait preuve, pour ton intérêt dans mon sujet de thèse, pour les conseils que tu m'as apportés. Merci d'être là, tous les jours et tout le temps, depuis un bon moment. Mais aussi à mes amis, Adeline, Jean-Baptiste, Sha, et tous mes amis niçois qui ont su me regonfler le moral et m'accueillir en grandes pompes malgré la distance et la rareté de mes visites.

Et enfin, merci aux rats ! A toutes ces petites bêtes qui ont permis de réaliser ce projet. Merci également à ceux qui m'ont aidée lors des adoptions. Franck Baron, Valérie Lavallée, l'équipe zootechnie pour s'être occupés des animaux et pour leur implication dans les procédures d'adoption, l'association White Rabbit, et les adoptants.

A ma mère, Frédérick et Christophe

TABLE DES MATIERES

Préambule	
Chapitre 1: Introduction générale	1
Historique : émotions et neuroanatomie.....	3
Partie 1 : le réseau de la peur chez l'homme et le rongeur : rôles fonctionnels, régulations et dysfonctionnements au cours du développement	9
I.Fonctionnalité du circuit de la peur : l'amygdale, le cortex préfrontal, l'hippocampe.....	13
A. Etude du comportement de peur	13
B. Présentation de l'amygdale et de sa fonctionnalité dans le conditionnement de peur Pavlovien.....	17
1. Anatomie.....	17
2. Fonctionnalité de l'amygdale au cours de l'apprentissage et de l'extinction de peur conditionnée	21
C. Le circuit de la peur : étude du réseau amygdalo-préfronto-hippocampique (APH)....	28
1. Etudes d'inhibitions et d'activations.....	29
2. Fonctionnalité du réseau amygdale-préfrontal dans l'apprentissage et l'extinction du conditionnement de peur Pavlovien	33
II.Etudes du comportement de peur au cours du développement du circuit APH	38
A. Régulation de la peur chez les adolescents et les adultes	40
B. Rôle du stress au cours du développement postnatal dans l'apparition de pathologies liées au circuit de la peur.....	45
1. Etudes comparatives de l'impact du stress chez l'adolescent : Conséquences sur le niveau d'anxiété.....	48
2. Conséquences du stress à l'adolescence sur l'apprentissage et la mémoire spatiale	49
3. Conséquences du stress à l'adolescence sur l'anxiété en tâche exploratoire et en comportement de peur.....	51

Partie 2 : Développement structurel et fonctionnel du circuit APH et caractéristiques cellulaires	59
A. Généralités sur les évènements cellulaires et structurels apparaissant entre la période prénatale et l'adolescence	62
1. Projections du BLA vers le cortex préfrontal.....	64
2. Développement des projections du cortex préfrontal vers le BLA.....	68
3. Développement des projections du vHPC vers le mPFC	73
B. Développement de la transmission glutamatergique et GABAergique entre l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal.....	75
1. Développement de la transmission AMPA/NMDA et manifestations comportementales.....	75
2. Développement du système GABAergique dans l'amygdale et le cortex préfrontal.....	80
3. Fonctionnalité de la transmission GABAergique dans le circuit APH.....	83
Partie 3 : caractéristiques neurobiologiques des troubles émotionnels	89
I.Troubles émotionnels liés à des mutations génétiques : cas de la voie de signalisation mTOR	91
A. Fonctionnalité de la voie de signalisation mTOR	92
B. Implication de la voie mTOR dans les troubles neurodéveloppementaux	97
II.Neurobiologie du stress	99
A. Altérations de la morphologie des structures du circuit APH en situation de stress ..	100
B. Conséquences du stress chez le juvénile et l'adolescent, et des troubles émotionnels associés, sur la fonctionnalité du circuit APH.	103
III.Le syndrome de stress post-traumatique	107
A. Présentation du syndrome de stress post-traumatique.....	107
B. Caractéristiques neurobiologiques du PTSD	109
C. Modèles animaux du PTSD.....	113
OBJECTIFS DE LA THESE.....	119

Chapitre 2 : Impacts d'une modulation de la protéine Tsc2 dans l'amygdale chez le rat à l'adolescence précoce et tardive sur le comportement de peur et l'activité du cortex préfrontal médian à l'âge adulte..... 123

Abstract..... 126

1. Introduction 127

2. Materials and Methods 130

2.1 Animals..... 130

2.2 Viral preparation and viral efficacy analysis 130

2.3 Surgery and viral infusion 131

2.4 Behavioral assessment: Fear conditioning..... 132

2.5 Biochemical and molecular studies..... 133

2.6 Detection of c-FOS(+) cells by immunohistochemistry 135

2.7 Statistical analysis..... 137

3. Results 139

3.1 Lentiviral transduction efficiency..... 139

3.2 Behavioral outcomes of Tsc2 partial inhibition in basolateral amygdala 140

3.3 Basal neural activity changes following Tsc2 partial inhibition in basolateral amygdala 144

4. Discussion 148

Figures..... 154

Supplementary Figures..... 163

References 177

Chapitre 3: Discussion générale et conclusion 185

I. Discussion des résultats obtenus 188

A. Conséquences de la modulation de la voie Tsc2/mTOR dans l'amygdale sur l'activité cellulaire..... 188

1. Efficacité virale et voie de signalisation Tsc2/mTOR 188

2. Etude de l'activité c-FOS dans le BLA 192

3. Etude de l'activité c-FOS dans le cortex préfrontal 194

B. Impact fonctionnel de l'activité c-FOS sur le comportement de peur..... 196

1. Conséquences fonctionnelles de l'activité c-FOS dans le mPFC sur le comportement de peur..... 196

2. Les animaux injectés à l'adolescence précoce présentent des symptômes typiques du PTSD à l'âge adulte..... 200

II. Perspectives de recherche 209

A. Perspectives sur la fonctionnalité des cellules transduites..... 209

B. Perspectives sur l'aspect comportemental 210

C. Autres perspectives autour de la perturbation mTOR/Tsc2 amygdalienne 213

CONCLUSION GENERALE 217

Références..... 221

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1.1 : Anatomie comparative du circuit de la peur chez l'Homme et le rongeur. (Page 12)

Figure 1.2 : Schéma illustrant les différents types de conditionnement de peur Pavlovien. (Page 16)

Figure 1.3 : Représentation schématique des principaux noyaux de l'amygdale. (Page 18)

Figure 1.4 : Représentation schématique des afférences et efférences des différents noyaux amygdaliens. (Page 20)

Figure 1.5 : Schéma simplifié représentatif de la fonctionnalité du circuit de la peur lors de l'apprentissage et l'extinction de peur conditionnée. (Page 26)

Figure 1.6 : Circuiterie impliquée au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée et de son expression entre le BLA et le mPFC. (Page 34)

Figure 1.7 : Schéma récapitulatif des afférences et efférences principales du circuit APH régulant l'expression et l'extinction de la peur conditionnée. (Page 37)

Figure 1.8 : Représentation schématique de la rétention de l'extinction au cours de l'adolescence. Il apparaît que les altérations observées dans la rétention de l'extinction au cours de l'adolescence requièrent à la fois un conditionnement de peur et son extinction pendant l'adolescence. (Page 44)

Figure 1.9 : Schéma récapitulatif d'études comportementales évaluant les effets du stress au cours de l'adolescence du rat sur le comportement mnésique, anxieux, et émotionnel à l'âge adulte. (Page 55)

Tableau 1.1 : Représentation du développement des projections entre le BLA et le mPFC chez le rat entre PN5 et PN26. (Page 65)

Figure 1.10 : Schémas représentatifs des modifications neuroanatomiques du cortex préfrontal et de l'amygdale au cours du développement cérébral chez le rongeur. (Page 70)

Figure 1.11 : Schéma récapitulatif des processus développementaux bidirectionnels qui apparaissent dans le circuit amygdale – cortex préfrontal entre l'âge juvénile et l'âge adulte chez le rat. (Page 72)

Tableau 1.2 : Tableau (non exhaustif) récapitulatif des rôles de la transmission AMPA et NMDA dans l'extinction de peur conditionnée. (Page 79)

Figure 1.12 : Représentation schématique de la voie de signalisation mTOR. (Page 93)

Figure 1.13 : Schéma représentatif du protocole expérimental réalisé au cours de cette thèse. (Page 121)

Chapitre 2 : Article

Figure 2.1: *In vitro* characterization of Tsc2-targeting virus efficiency. (Page 154)

Figure 2.2: *Ex vivo* characterization of Tsc2-targeting virus efficiency following injection in basolateral amygdala. (Page 155)

Figure 2.3: Overgeneralization to a new tone in rats injected with Vir1_Tsc2 at PN25. (Page 156)

Figure 2.4: Basal neural activity was higher in prelimbic cortex later in adulthood in rats injected with an active virus in the BLA at PN25. (Page 158)

Figure 2.5: Density Heat Map of c-FOS-positive cells in prelimbic and infralimbic cortices in rats injected with Vir1_Tsc2 and Vir_ctrl in BLA at adolescence (PN25). (Page 159)

Figure 2.6: Density Heat Map of c-FOS-positive cells in prelimbic and infralimbic cortices in rats injected with Vir1_Tsc2 and Vir_ctrl in BLA at adulthood (PN50). (Page 160)

Figure 2.7: Number of c-FOS(+) cells in different cortical layers of prelimbic and infralimbic cortices in rats injected in the BLA during adolescence (PN25). (Page 160)

Supplementary Figures

Supplementary Figure 2.1: Lentiviral-vector mechanisms of action. (Page 163)

Supplementary Figure 2.2: *Ex vivo* characterization virus transduction following injection in the basolateral amygdala. (Page 150)

Supplementary Table 2.1: Detailed statistical analysis of the fear conditioning experiment. (Page 164)

Supplementary Figure 2.3: Vir2_Tsc2 had similar effects than Vir1_Tsc2 on fear behavior in PN25_injected rats. (Page 166)

Supplementary Table 2.2: Helmert contrast analysis of percent freezing to context or to tones in rats injected at PN25. (Page 167)

Supplementary figure 2.4: Density Heat Map of c-FOS-positive cells in prelimbic and infralimbic cortices from rats injected with Vir1_Tsc2 or Vir_ctrl in BLA at adolescence (PN25) at AP 2.7. (Page 168)

Supplementary Table 2.3: Statistical analysis of c-FOS(+) density heat maps from adult rats injected at PN25 or PN50. (Page 169)

Supplementary figure 2.5: Density Heat Map of c-FOS-positive cells in prelimbic and infralimbic cortices in rats injected with Vir1_Tsc2 and Vir_ctrl in BLA at adulthood (PN50) at AP 2.7. (Page 170)

Supplementary figure 2.6: Number of c-FOS(+) cells in different cortical layers of prelimbic and infralimbic cortices in rats injected in the BLA during adulthood (PN50). (Page 171)

Supplementary Table 2.4: Statistical analysis comparing the number of c-FOS(+) cells in different layers of prelimbic or infralimbic cortices depending on the viral condition for both ages of injection at both antero-posteriority from Bregma. (Page 172)

Supplementary figure 2.7: Principal Component Analysis and linear regression comparing freezing behavior and c-FOS counting in mPFC of PN25_injected animals. (Page 173)

Chapitre 3 : Discussion

Figure 3.1 : Conséquences de la perturbation de la voie mTOR au cours de l'adolescence sur la fonctionnalité des cellules du BLA. (Page 195)

Figure 3.2 : Expression de c-FOS mesurée dans le PL et l'IL en fonction de la tâche comportementale en conditionnement de trace. (Page 198)

Figure 3.3 : Représentation schématique de la fonctionnalité entre l'amygdale et le cortex préfrontal dans notre modèle au travers des mesures de l'expression c-FOS basale. (Page 208)

PREAMBULE

Le circuit de la peur, comprenant en partie l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal est un système très conservé essentiel pour la mise en place de l'apprentissage de la peur, de sa rétention en mémoire, mais aussi de son extinction et de sa contextualisation. Ce circuit subit d'importantes modifications structurelles et fonctionnelles avec un développement asynchrone de ces structures de la vie juvénile jusqu'à l'âge adulte. En effet, les structures limbiques comme l'amygdale sont matures à l'âge juvénile, suivi de l'hippocampe qui est pleinement fonctionnel au cours de l'adolescence, tandis que le cortex préfrontal médian n'est pas mature avant l'âge adulte. Ces trois phases de développement cérébral sont marquées par des restructurations massives des connectivités au sein des structures et entre les structures, de la maturation des systèmes inhibiteurs et excitateurs, ainsi que de la fonctionnalité des voies de signalisation associées à la mise en place de la plasticité synaptique et de la mémoire à long terme. Ces phases développementales sont marquées par des caractéristiques comportementales, en particulier au moment de l'adolescence où l'immaturation du cortex préfrontal induit chez l'humain et chez les animaux une résistance à l'extinction de peur conditionnée. Cet événement passager dans la vie d'un individu est physiologique et favorise la prise d'indépendance, la prise de risque et le maintien en mémoire d'une situation dangereuse pour que cet individu puisse adapter son comportement lorsqu'il atteindra l'âge adulte. Cependant, cette période ouvre aussi une fenêtre de haute vulnérabilité aux facteurs environnementaux tels que le stress qui est responsable de l'apparition de désordres physiologiques et comportementaux à l'âge adulte, comme le développement des troubles anxieux, de la dépression, ou encore potentiellement du syndrome de stress post traumatique (PTSD). Le PTSD est un désordre dans l'équilibre d'activité du circuit de la peur qui est marqué par une augmentation de l'activité de l'amygdale, une hypo-fonction du cortex préfrontal et de l'hippocampe ventral, entraînant une mosaïque de symptômes qui allient troubles anxieux, phobies, dépression et addictions. Les mécanismes d'apparition du PTSD sont de nos jours encore peu connus, et la variabilité interindividuelle au développement de ces symptômes face à l'exposition à un événement traumatique est élevée. La plupart de ces troubles se développent au cours de l'enfance et de l'adolescence au moment où le cerveau subit ses restructurations, et qu'ils ont tendance à se consolider voire à s'amplifier à l'âge adulte.

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GENERALE

HISTORIQUE : EMOTIONS ET NEUROANATOMIE

Les émotions sont aujourd’hui définies comme étant un ensemble de réactions comportementales et somatiques transitoires déclenchées par des événements extérieurs à un individu et nécessaires pour adapter un comportement face à une situation donnée (Matsumoto et Ekman, 2009). Historiquement, les émotions ont longtemps été décrites dans un point de vue psychologique et social, au gré des courants philosophiques et des avancées scientifiques et médicales de chaque époque. Le terme « émotion », de racine latine *Emovere*, « en mouvement » proviendrait d’un ensemble de concepts formés depuis la Grèce antique jusqu’à nos jours. Ainsi, Aristote définissait en -329 (*La Rhétorique*, Livre II) les émotions sous le terme de *kinesis* et les décrivit au nombre de 4 : la colère, la pitié, la peur et le désir. Les latins utilisaient plutôt le terme *motus animi*, ou autrement dit le « mouvement de l’âme ». C’est en 1649 que René Descartes introduisit dans son traité « Les passions de l’âme » le terme « émotion », signifiant dans le français de l’époque « une agitation » qu’il décrivit comme des états de « passion » simples et communs à tous : l’admiration, la haine, l’amour, le désir, la joie, et la tristesse. Ces trois notions historiques ont pour point commun la théorie selon laquelle l’expression émotionnelle proviendrait de mouvements de l’esprit face à une situation extérieure à l’individu. Ces « mouvements » pourraient être avantageux pour la survie et la vie sociale de l’individu ou, au contraire, lui seraient néfastes ou non conventionnels vis-à-vis des contextes sociaux de chacune de ces époques.

D’un point de vue évolutif, l’adaptation de son comportement face à des situations spécifiques est essentielle pour la survie d’un individu. Ainsi des théories évolutionnistes des émotions émergent au cours de l’Histoire, et notamment à partir des travaux de Charles Darwin en 1872 dans son ouvrage « L’expression des émotions chez l’Homme et les animaux » qui met en lien le caractère inné et universel entre les espèces de l’expression des émotions, pour permettre la communication entre individus, l’adaptation comportementale à son environnement et sa survie en fonction des situations auxquelles il est confronté (Darwin, 1872). Aujourd’hui, nous savons que les émotions s’accompagnent d’expressions faciales, corporelles et langagières représentées universellement chez tous les humains, quels que

soient leurs cultures (LeDoux, *The emotional brain*, 1996). Chez l'animal, on ne parle pas d'émotions en termes de ressentis subjectifs, comme distingués chez l'Homme, puisqu'un animal n'est à priori pas capable d'évaluer l'intensité de son émotion, ni d'en avoir une pleine conscience. On parlera plutôt d'émotion animale au travers de son expression comportementale suite à un stimulus (la fuite face à un danger, l'approche face à de la nourriture) et l'activation des structures qui médient ces réponses et qui sont communes à celles de l'Homme (Anderson et Adolphs, 2015). L'expression des émotions serait donc conservée dans la phylogénie et constituerait un avantage évolutif favorisant la survie des espèces.

Il existe encore aujourd'hui de nombreuses théories sur les émotions. La plus répandue, la théorie neuroculturelle, fait suite aux observations d'Ekman en 1986, qui a établi à partir de comparaisons et de reconnaissance d'expressions faciales chez l'Homme qu'il existe 6 émotions dites « primaires » : la joie, la peur, la tristesse, le dégoût, la colère et la surprise (Ekman et Friesen, 1986), avec des émotions complexes qui découlent de la combinaison de ces émotions primaires (Ortony et Turner, 1990), et qui suivent des modèles d'expression distincts et spécifiques selon les situations auxquelles un individu est confronté. La théorie neuroculturelle est cependant un sujet controversé, puisque d'autres psychologues proposent que l'expression des émotions émerge surtout du contexte culturel et de l'histoire de chaque individu, et qu'elles évoluent en fonction du vécu et de l'expérience personnelle (Livre : Alan J. Fridlund, 1994, « *Human Facial Expression : An evolutionary view* », Academic Press ; Frijda, 1995). Parmi les autres théories psychologiques actuelles sur les émotions, certaines proposent la notion d'émotion non pas en termes de « modèles », mais plutôt en tant que « syndrome multi-composantiel » (Scherer, 1984), c'est-à-dire les réponses physiologiques (somatiques), motrices, cognitives et ressenties combinées pour faire face à une situation spécifique ou pour réagir à des stimuli environnementaux de manière adaptée à une situation.

La distinction entre le cerveau et l'esprit a été une idée très favorisée au cours de l'Histoire, mais a retardé la découverte des rôles de certaines structures cérébrales dans la régulation des processus émotionnels. Ce n'est qu'à la fin du XIXe siècle que le concept de neuroanatomie des émotions commence à voir le jour. Le cas très connu de Phineas Gage, rapporté dans *l'American Journal of the Medical Science* en 1850, décrit des changements

brutaux de personnalité avec une perte des règles morales, de l'apparition de comportements inappropriés et d'une personnalité impulsive et colérique à la suite d'un accident ayant provoqué une lésion cérébrale par une barre de fer logée dans son cortex préfrontal (Harlow, 1850). Les relations entre le cerveau et l'esprit forment donc alors aux yeux de la communauté scientifique une seule et même entité.

En 1937, à partir des théories proposées par Christofredo Jakob au début du XXe siècle, James Papez proposa le système limbique et le définit comme étant « le siège anatomique des émotions », constitué d'un ensemble de structures cérébrales responsables de la gestion des émotions, dont l'hippocampe, l'amygdale, les corps mamillaires, le cortex cingulaire, l'hypothalamus et le thalamus (Papez, 1937). Le rôle de ces structures dans les processus de régulation des émotions se confirme par Klüver et Bucy en 1939 qui décrivent un syndrome éponyme faisant suite à l'ablation de lobes temporaux de macaques Rhésus (*Macaca mulatta*) (Klüver et Bucy, 1939). Ces derniers ont présenté une inaptitude à discerner les informations sensorielles environnantes pour adapter un comportement. Ce symptôme, appelé « cécité psychique », se manifeste par une perte des instincts de peur des animaux face à un serpent, leur prédateur naturel. C'est en 1956 que Weiskrantz fit le lien entre l'ablation spécifique de l'amygdale, logée dans les lobes temporaux, et le syndrome de Klüver-Bucy (Weiskrantz, 1956). Il supposa que l'amygdale était la structure nécessaire pour faire le lien entre un stimulus et sa représentation émotionnelle. Plus tard, en 1974, Arthur Kling rajouta au syndrome de Klüver-Bucy le rôle psychosocial du lobe temporal, puisque son ablation – en particulier celle de l'amygdale – chez le macaque a provoqué chez l'animal une incapacité à décoder et à analyser les gestes sociaux essentiels à la communication au sein de l'espèce tels que les gestes et expressions faciales de soumission (Kling, 1974). L'incapacité de l'animal à évaluer les expressions de ses congénères et à les interpréter a résulté en un abandon de l'animal par ses congénères, aboutissant à sa mort.

Dans une approche évolutionniste, Paul MacLean proposa en 1949 le concept du « cerveau tripartite » constitué du « cerveau reptilien », siège des fonctions primaires de survie, du système limbique, appelé « cerveau des émotions », et du néocortex, « organe de raison » propre à l'humain (Maclean, 1949). Aujourd'hui, ce modèle proposé par MacLean est dépassé. Les neuroanatomistes actuels s'accordent à dire qu'il n'y a pas un centre propre à chaque

émotion et chaque fonction cognitive, mais qu'il existerait plutôt des systèmes composés de plusieurs unités cérébrales interagissant entre elles dans la gestion des émotions (amygdale, hippocampe, cortex, hypothalamus, tronc cérébral...), dont les fonctions sont communes aux différentes espèces animales, et donc conservées au cours de l'évolution. C'est ainsi qu'émergent, au fur et à mesure des avancées scientifiques et médicales, les rôles des différentes structures cérébrales et de leur formation en réseaux fonctionnels dans la régulation des processus cognitifs et émotionnels. La formation de ces structures en réseaux est conservée entre les espèces et suit un modèle de développement très spécifique, coïncidant avec l'apparition de ces structures au cours de l'évolution des espèces : des structures aux fonctions les plus basiques (système nerveux autonome) aux structures impliquées dans la formation de la mémoire, du langage ou de l'orientation spatiale, puis des structures régulant les fonctions exécutives, d'attention ou de coordination. Ensemble, elles interagissent entre elles et leurs bonnes fonctionnalités permettent à un individu d'adapter un comportement face à une situation donnée. Une dérégulation de cet équilibre fonctionnel entraîne des défauts d'adaptation comportementale, et aboutissent à l'apparition de pathologies émotionnelles telles que le stress, l'anxiété ou le syndrome de stress post traumatique.

Cette thèse se concentre spécifiquement sur la fonctionnalité du circuit de la peur dans un modèle rongeur. Constitué de plusieurs structures dont l'amygdale, le cortex préfrontal et l'hippocampe, ce circuit très conservé est un parfait exemple du modèle de développement non linéaire dans le temps, avec une fonctionnalité différentielle au cours du développement d'un individu et des manifestations comportementales qui dépendent de son stade de développement. Cette asynchronie développementale le rendant vulnérable aux éléments environnementaux et génétiques, une dérégulation de sa fonctionnalité favorise le développement des pathologies liées à la peur. Cette inadaptation entraîne l'apparition de troubles comportementaux tels que le syndrome de stress post traumatique, un trouble caractérisé par un état constant d'hypervigilance (nervosité, insomnies), des reviviscences de l'évènement traumatique (pensées intrusives et non contrôlées de l'évènement), et de troubles dépressifs (perte d'intérêt et de plaisir) (Manuel diagnostique et statistique des troubles mentaux, DSM V). D'autres inadaptations comportementales sont observées au travers des troubles de l'anxiété généralisée (état d'hypervigilance et de sensation de peur non contrôlée, avec ou sans troubles paniques, sans nécessairement de lien avec un évènement traumatique), ou encore

les troubles addictifs (Balogun et al., 2014; Brady and Sinha, 2005; Ledoux, 1996). La plupart du temps, les troubles anxieux, addictifs ou dépressifs sont comorbides chez un individu atteint de syndrome de stress post-traumatique. Il est donc nécessaire de comprendre le développement de ces réseaux spécifiques pour comprendre et traiter les désordres comportementaux retrouvés dans les pathologies anxieuses, sociales ou addictives chez l'humain.

PARTIE 1 : LE RESEAU DE LA PEUR CHEZ
L'HOMME ET LE RONGEUR : ROLES
FONCTIONNELS, REGULATIONS ET
DYSFONCTIONNEMENTS AU COURS DU
DEVELOPPEMENT

La régulation émotionnelle consiste en l'habilité à contrôler de manière consciente ou inconsciente des processus physiologiques et comportementaux face à des situations possédant une certaine valence émotionnelle. La valence d'une émotion pourrait être définie comme étant une dimension de l'émotion qui varie entre un état agréable ou désagréable avec un état neutre intermédiaire (Arnold, 1960). On distingue alors la valence d'une émotion de celle de « l'éveil émotionnel », définie comme étant un état d'excitation calme ou élevé face à cette même situation (Schachter et Singer, 1965). Dans le cas de la peur, la valence émotionnelle et l'éveil émotionnel qui découlent d'une situation potentiellement dangereuse permet à un individu d'adapter son comportement de manière consciente ou inconsciente dans le but de fuir, se défendre ou attaquer. On sait de nos jours que les informations provenant des structures sensorielles doivent interagir avec l'amygdale afin d'en déterminer la valence motivationnelle appétitive, aversive ou neutre, ce qui permet d'adapter un comportement (Geschwind, 1965; Kim, 2013) En neurosciences, on détermine la motivation selon trois processus : la motivation liée à une récompense (appétitif), la prise de décision (face à une situation dans laquelle un comportement doit être favorisé), et le comportement dirigé vers un but (anticipation d'un comportement pour obtenir une récompense ou une échappatoire selon si la valence est appétitive ou aversive). Dans les trois cas, la motivation fait intervenir plusieurs structures cérébrales dont l'amygdale, le noyau accumbens, le cortex orbitofrontal, médian et dorsolatéral, ainsi que le système dopaminergique de la récompense (aire tegmentale ventrale). Dans la gestion des émotions et de la peur, les différentes structures de ce circuit interagissent entre elles et la détermination de la valence est indispensable pour induire une motivation comportementale (fuir, se défendre, attaquer). Les stratégies comportementales alors mises en place dans les aspects aversifs sont intimement liées à l'activité du circuit de la peur, constitué de différentes structures telles que l'amygdale, le thalamus, le cortex préfrontal et l'hippocampe (Ledoux, 1996). Ensemble, elles forment un réseau fonctionnel hautement conservé et nécessaire à la survie d'un individu (**Figure 1.1**).

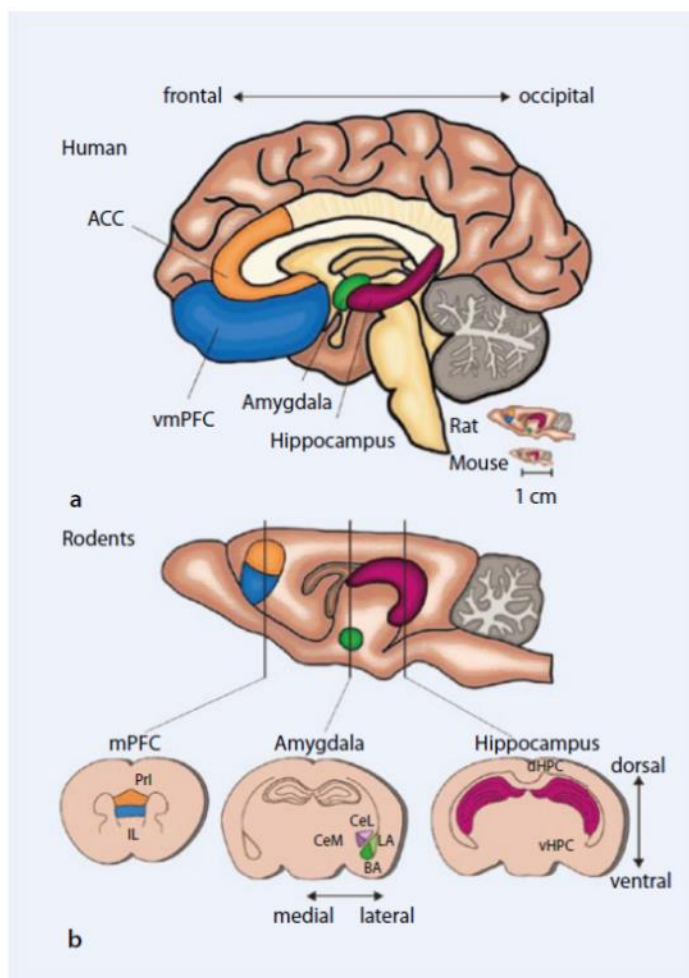


Figure 1.1 : Anatomie comparative du circuit de la peur chez l'Homme et le rongeur.

ACC : Cortex cingulaire antérieur ; **vmPFC** : Cortex préfrontal ventromédian ; **mPFC** : cortex préfrontal médian ; **Pri** : cortex prélimbique ; **IL** : Cortex infralimbique ; **CeL** : Noyau Centro-latéral de l'amygdale ; **CeM** : Noyau centro-médian de l'amygdale ; **LA** : noyau Latéral de l'amygdale ; **BA** : Noyau basal de l'amygdale ; **vHPC** et **dHPC** : hippocampe ventral et hippocampe dorsal. Selon Wotjak et Pape, 2013. Code couleur : régions cérébrales homologues entre l'Homme et le rongeur (rat et souris).

I. Fonctionnalité du circuit de la peur : l'amygdale, le cortex préfrontal, l'hippocampe

A. Etude du comportement de peur

La peur est une émotion caractérisée par l'activation innée de processus autonomes (augmentation du rythme cardiaque, de la pression artérielle), comportementaux (fuite, défense, attaque), endocrines (sécrétion d'hormones de stress en réponse à un stimulus aversif) et cognitifs (discrimination de situations sûres ou aversives, mise en place de stratégies d'évitement). Pour ce qui concerne la régulation du comportement de peur, la fonctionnalité de l'amygdale et des structures associées est étudiée au travers du paradigme du conditionnement Pavlovien (Pavlov, 1927). Dans les expériences de laboratoire, le conditionnement Pavlovien consiste en la présentation d'un stimulus sensoriel émotionnellement neutre, généralement auditif ou visuel, appelé stimulus conditionné (SC), qui prédit l'arrivée d'un stimulus inconditionné (SI) possédant une valence émotionnelle appétitive (nourriture) ou aversive (bref choc électrique sur les pattes) dans un contexte donné. Ainsi, après le premier appariement SC-SI (acquisition de l'apprentissage), la présentation seule du stimulus conditionné produit une réponse conditionnée anticipatrice du SI. Dans le cas du conditionnement de peur chez le rongeur, la présentation seule du SC initialement associé à un choc électrique produit des réponses comportementales de peur dont le *freezing*, défini par un arrêt total des mouvements exceptés les mouvements respiratoires (Blanchard and Blanchard, 1969; Sigmundi et al., 1980).

Dans la nature, l'apprentissage de peur conditionnée permet à une proie d'anticiper l'arrivée d'un prédateur par l'association entre une modalité sensorielle (la vue, le bruit, la réaction des congénères) et le risque mortel qu'il représente, et déclenche des réponses comportementales de fuite, de défense ou d'attaque. C'est donc un apprentissage conservé au cours de l'évolution et indispensable à la survie d'une espèce, mais qui nécessite cependant d'avoir été confronté au moins une fois à cette association afin de pouvoir avoir un comportement anticipateur. L'apprentissage d'une association conditionnée met en jeu des

processus mnésiques durables de par des mécanismes de plasticité synaptique se mettant en place dans le circuit de la peur. Ces mécanismes permettent ainsi de consolider cet apprentissage et la mémoire associée.

A l'inverse, l'extinction de la peur conditionnée consiste en la formation d'une nouvelle mémoire associée à une situation sûre (Pavlov, 1927). La présentation répétée du SC seul, dans le contexte initial d'apprentissage ou dans un nouveau contexte, permet, à elle seule, de créer une nouvelle association où le SC ne prédit plus l'arrivée d'un choc électrique (Maren et Quirk, 2004; Quirk et Mueller, 2008). Cette nouvelle mémoire permet donc la diminution progressive des réponses comportementales et somatiques de peur. En parallèle, l'hippocampe (dorsal et ventral) module l'activité de l'amygdale et y apporte les informations contextuelles et spatiales nécessaires à la discrimination de la situation (Corcoran et Maren, 2001; Maren et Fanselow, 1995; Hobin et al., 2006), tandis que le cortex préfrontal médian (mPFC), en communication directe avec l'amygdale et l'hippocampe, reçoit les informations du SC-SI et contextuelles, et favorise l'expression de l'extinction de la peur et sa rétention en mémoire. (Morgan et al., 1993)

Cependant, la mémoire de l'extinction ne supprime pas la mémoire de l'association originale SC-SI puisque la peur conditionnée peut être évoquée à nouveau au travers de plusieurs mécanismes. La mémoire de l'extinction est plus labile dans le temps que la mémoire de l'apprentissage SC-SI, et un retour spontané de peur (*spontaneous recovery*) à la présentation seule du SC est observé au bout d'un certain délai sans remise en situation (Brooks et Bouton, 1993; Rescorla, 2004). Par ailleurs, le contexte dans lequel l'apprentissage de peur conditionnée a été mis en place est un élément important dans l'association SC-SI. En effet, l'extinction est contexte-dépendante, puisque si elle s'est déroulée dans un contexte différent, la remise en situation dans le contexte initial d'apprentissage, après l'extinction, suffit à induire un retour de peur lors de la présentation seule du SC dans ce contexte (*renewal*). Enfin, si un animal est à nouveau exposé au stimulus inconditionné après apprentissage de l'extinction, cette seule exposition suffit à faire réapparaître des réponses comportementales de freezing lorsque l'animal est par la suite réexposé à la présentation seule du SC (*reinstatement*, rétablissement) (Bouton, 2002; Bouton et Ricker, 1994). La mémoire initiale de la peur conditionnée reste donc robuste au cours du temps (Repa et al., 2001; Rescorla, 2001),

traduisant alors un avantage évolutif afin d'anticiper des situations potentiellement néfastes pour sa survie.

Il est néanmoins important de souligner qu'en laboratoire, de très nombreuses études sur le rongeur ont évalué les différentes réponses comportementales de peur au travers de différents protocoles de conditionnement de peur. Ces études ont utilisé des protocoles de conditionnement au contexte, ou bien des conditionnements de trace ou de délai avec un stimulus conditionné (souvent un son), qui font intervenir de manière différentielle les structures du circuit de la peur (**Figure 1.2**). En effet, au cours de l'apprentissage conditionné simple, on sait que la fonctionnalité de l'hippocampe ventral est requise pour intégrer les différentes composantes contextuelles, mais n'est pas nécessaire à la formation de la mémoire de l'association son-choc en soi (Chen et al., 2016). En revanche, lors d'un apprentissage conditionné au contexte, qui consiste en l'appariement d'un contexte (SC) avec un choc électrique (SI), son activité est indispensable pour l'apprentissage associatif contexte – choc électrique et sa rétention en mémoire (Hobin et al., 2006). Le conditionnement de trace, quant à lui, consiste en un protocole de conditionnement Pavlovien avec une association SC-SI dans lequel il existe un intervalle (court ou long) entre la fin du SC et le début du SI, et requiert la bonne fonctionnalité de l'hippocampe dorsal (Kim et al., 1995) et ventral (Esclassan et al., 2009). En effet, l'hippocampe dorsal serait impliqué dans le maintien en mémoire du délai entre la fin du SC et le début du SI, tandis que l'hippocampe ventral contribuerait à réguler l'aspect émotionnel, en permettant de maintenir l'expression de la peur. Le conditionnement de trace nécessite également l'activité du cortex préfrontal (Gilmartin et Helmstetter, 2010) qui maintient une activité pendant toute la durée de la trace. Enfin, le conditionnement de peur de délai consiste en la présentation du SI de manière concomitante avec la fin de la présentation du SC (**Figure 1.2**).

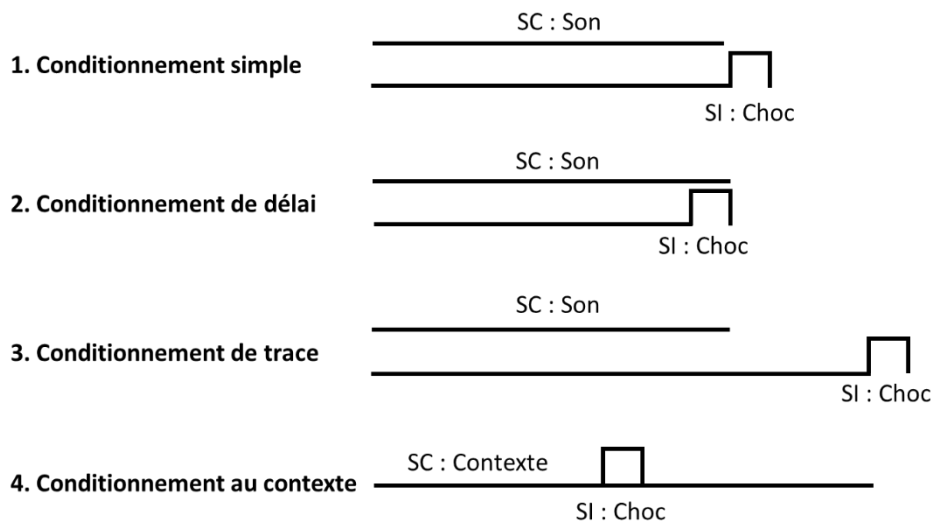


Figure 1.2 : Schémas illustrant les différents types de conditionnement de peur Pavlovien

Ces types de conditionnement associatifs faisant intervenir de manière différentielle les structures du réseau de la peur, il est important de les distinguer pour comprendre la fonctionnalité du circuit en fonction de la tâche comportementale. Cependant, il est à noter qu'à l'heure actuelle, il n'existe pas de distinctions dans la fonctionnalité des structures entre le conditionnement simple et le conditionnement de délai. Le conditionnement de délai est principalement utilisé pour mettre en évidence les structures associées à l'apprentissage d'une durée et est souvent comparé avec les protocoles de conditionnement de trace. En effet, dans les deux cas, les animaux doivent apprendre que le stimulus conditionné apparaît à un certain moment au cours de l'apparition du son (délai) ou après l'apparition du son (trace). Dans le cadre de cette thèse, nous nous concentrons préférentiellement sur les protocoles de conditionnement de peur Pavlovien simples qui sont principalement utilisés pour étudier la fonctionnalité du circuit de la peur. Dans notre cas, nous nous concentrerons plus particulièrement sur la fonctionnalité du réseau Amygdale-cortex préfrontal (AP) dont la dysfonction laisse apparaître des troubles émotionnels liés à la peur, aisément mesurables au travers du conditionnement Pavlovien simple.

B. Présentation de l'amygdale et de sa fonctionnalité dans le conditionnement de peur Pavlovien

1. Anatomie

L'amygdale est une structure en forme d'amande située bilatéralement dans la partie médiane des lobes temporaux. Elle est constituée de différents noyaux d'origines embryonnaires différentes, résultant en une composition cellulaire spécifique et unique entre les différents groupes de noyaux. Les noyaux latéraux (LA) et les noyaux basaux latéraux (BL) et médians (BM) (formant à eux deux l'amygdale basale, BA) proviennent de feuilletts embryonnaires communs à ceux du cortex et constituent dans leur ensemble le complexe « Amygdale BasoLatérale » (BLA) (Brodal, 1947; McDonald, 1982) (**Figure 1.2**). De par leurs origines embryonnaires, le BLA est constitué à 80% de cellules glutamatergiques et à 20% d'interneurones GABAergiques inhibiteurs permettant une régulation locale de l'excitabilité des cellules glutamatergiques (McDonald, 1982, 1984; Mcdonald, 1991; Spampanato et al., 2011; Woodruff et al., 2006).

Parmi les neurones constituant l'amygdale, seuls 20% d'entre eux sont suffisants pour induire un apprentissage conditionné et une réponse comportementale (Han et al., 2007; Rumpel et al., 2005) grâce à leur organisation en microcircuits distincts dont l'activité permet d'induire ou d'inhiber le comportement de peur (Herry et al., 2008). Il a ainsi été démontré que trois groupes de neurones de l'amygdale sont engagés dans la réponse au SC (Amano et al., 2011; Herry et al., 2008; Repa et al., 2001) : les « cellules de peur » qui développent des réponses excitatrices au SC, et dont l'activité diminue après l'apprentissage de l'extinction ; les « cellules de l'extinction » qui répondent au SC après l'apprentissage de l'extinction ; et les cellules « extinction résistantes » qui répondent au SC à la fois après l'apprentissage et après l'extinction de la peur.

Les noyaux centraux médians (CeM) et latéraux (CeL) constituent quant à eux l'Amygdale Centrale (CeA) et dérivent de feuilletts embryonnaires communs au striatum (Cassell et Wright, 1986; Ehrlich et al., 2009; McDonald, 1982; Swanson et Petrovich, 1998). Entre ces structures se trouvent des zones riches en cellules GABAergiques, appelées cellules intercalées (ITC) (Nitecka et Ben-Ari, 1987), qui produisent une importante source d'inhibition au sein des connections intra et extra amygdaliennes (Busti et al., 2011; Royer et Paré, 1999; Smith et Paré, 1994) et qui permettent de réguler les réponses comportementales (Marowsky et al., 2004; Royer et Paré, 2002). (**Figure 1.3**)

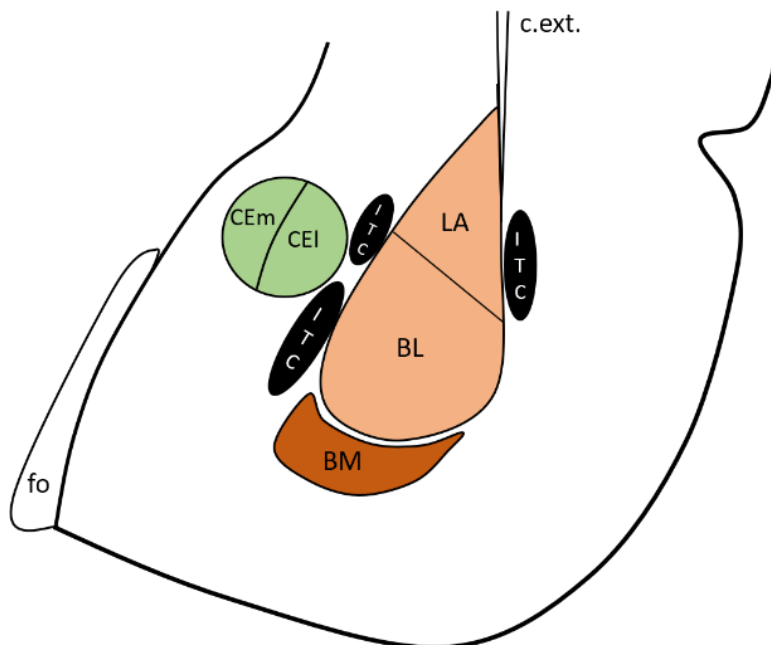


Figure 1.3 : Représentation schématique des principaux noyaux de l'amygdale.

On distingue ici les noyaux amygdaliens selon trois groupes : les noyaux centraux (vert), latéraux et basaux (rouge) et les cellules intercalées (noires).

CEm, CEI : noyaux centraux (subdivisions médianes et latérales) ; **LA** : noyau latéral de l'amygdale ; **BL, BM** : noyaux basaux de l'amygdale (subdivisions latérales et médianes) ; **ITC** cellules intercalées ; **c.ext** : fibres de la capsule externe ; **fo** : fibre optique.

Le noyau central de l'amygdale est majoritairement constitué de cellules GABAergiques (McDonald, 1982). Lorsqu'il est activé, il permet l'induction des réponses physiologiques et comportementales de peur au travers d'une désinhibition de différentes structures telles que le *bed nucleus of the stria terminalis* (BNST), la matière grise périaqueducale (PAG) et l'hypothalamus (LeDoux, 1996) (**Figure 1.4**). L'activation de ces dernières par le CeA favorise respectivement l'expression comportementale de la peur, la modulation du système nerveux sympathique et la production d'hormones de stress.

Ainsi, au cours de l'apprentissage de la peur, de son expression et de son extinction, les noyaux amygdaliens, interconnectés entre eux et avec de nombreuses structures cérébrales, intègrent et transmettent les informations pour induire et adapter les réponses comportementales et somatiques de peur citées précédemment. Ce circuit de la peur, constitué d'une dizaine de structures corticales et sous corticales différentes, constitue un réseau dense dont la bonne fonctionnalité est indispensable pour l'induction d'un comportement adapté à chaque situation (**Figure 1.4**).

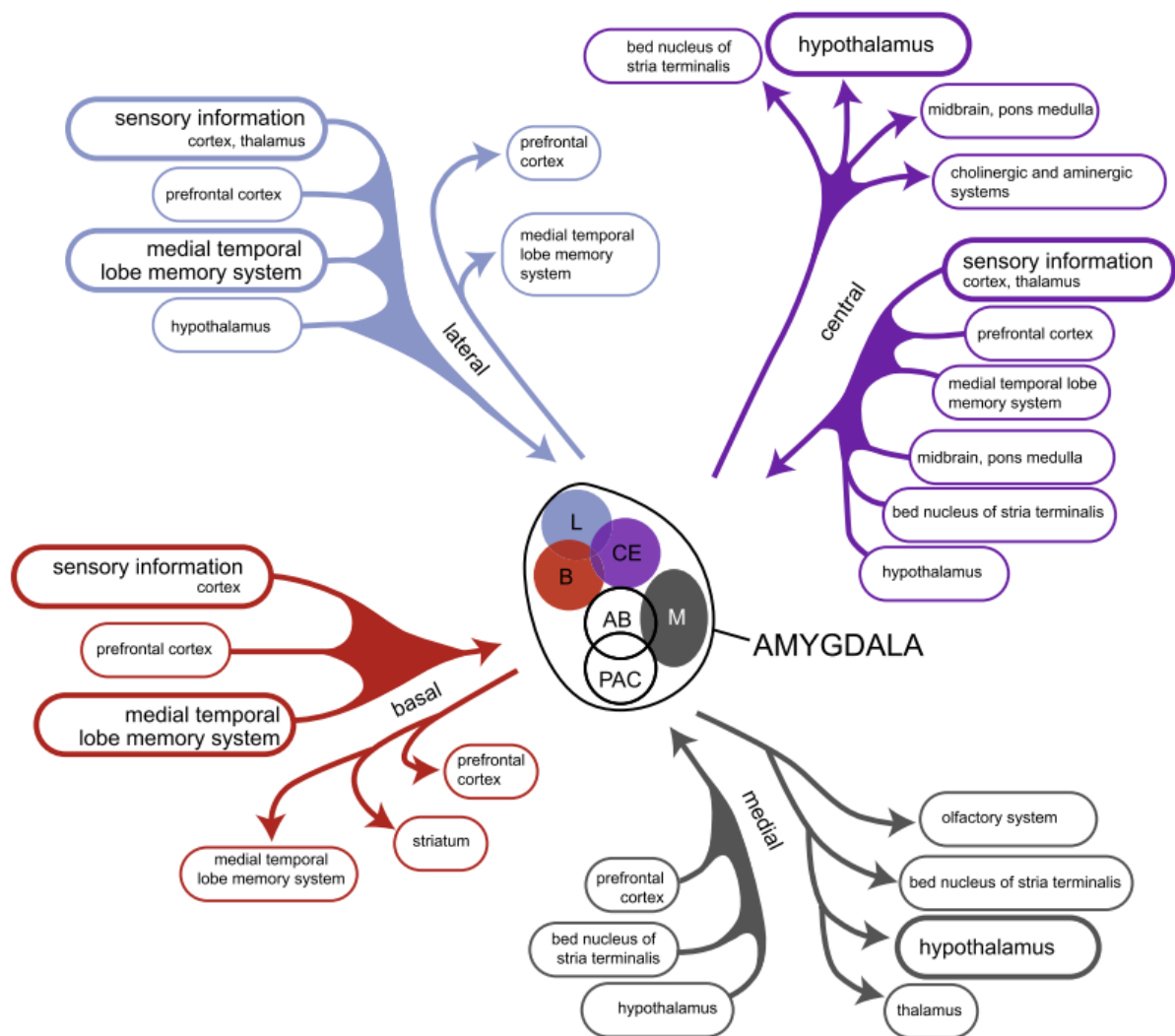


Figure 1.4 : Représentation schématique des afférences et des efférences des différents noyaux amygdaliens. Selon Loonen and Ivanova 2016, réadapté de Pitkänen et al., 2000.

Chaque couleur représente les afférences ou les efférences associées aux différents noyaux amygdaliens. Les efférences à partir du LA (bleu) et du BA (rouge) projettent vers le cortex préfrontal médian ou le striatum, tandis qu'ils reçoivent des afférences de la part des systèmes sensoriels et endocrines (hypothalamus).

Le noyau central (violet) permet d'induire l'expression comportementale de peur et l'activation du système endocrinien au travers de ses efférences et afférences avec le bed nucleus of stria terminalis, le bulbe rachidien (*midbrain*, *pons medulla*) ou encore l'hypothalamus.

L : Amygdale latérale; **B** : Amygdale basale; **CE** : Amygdale centrale; **AB** : noyaux accessoires basaux ; **PAC** : Cortex périamygdaloïde ; **M** : Amygdale médiane

Dans cette figure est mise en évidence la complexité des afférences et des efférences entre les noyaux de l'amygdale et les structures extra-amygdaliennes. Dans cette thèse, nous ne discuterons pas de toutes les structures appartenant au circuit de la peur, mais nous nous concentrerons sur le circuit de la peur « apprise », en particulier entre l'amygdale et le cortex préfrontal. En effet, le circuit de la peur ne possède pas une activité limitée au conditionnement Pavlovien (peur apprise), mais il est également impliqué dans les processus de peur innée (à un prédateur) qui impliquent des fonctionnalités différentielles des noyaux amygdaliens et des structures associées. En effet, alors que la peur apprise implique la fonctionnalité des structures telles que l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal, la peur innée relève de la bonne fonctionnalité d'un circuit dont les stimuli inconditionnés sont associés au prédateur et qui comprend en plus l'activité du système hypothalamique et sensoriel comme le cortex olfactif, visuel ou auditif (Silva, et al., 2016).

2. Fonctionnalité de l'amygdale au cours de l'apprentissage et de l'extinction de peur conditionnée

Les expériences de lésions ou d'activations de l'amygdale chez différentes espèces animales (chat, Homme, rongeur) l'ont rapidement caractérisée comme étant une structure très conservée entre les espèces et essentielle à la reconnaissance de stimuli aversifs et à l'induction de l'expression de la peur (Blanchard et Blanchard, 1972; Goddard, 1964) au travers de la mise en place d'une plasticité à long terme dans le BLA. En effet, au cours de l'apprentissage de peur conditionnée, l'association SC-SI dans le BLA induit la formation d'une plasticité synaptique à long terme régie sous les lois de la plasticité de Hebb : Selon les hypothèses proposées par Donald Hebb en 1949, lorsqu'un neurone, lui-même excité, reçoit en plus une excitation répétée et persistante d'un neurone présynaptique, la transmission entre ces deux neurones se renforce et se facilite, augmentant ainsi l'efficacité de la stimulation du neurone présynaptique sur le neurone post-synaptique. Ces mécanismes induisent ainsi des activations du métabolisme et de l'activité de la cellule post-synaptique, qui transmet à son tour les informations vers d'autres « assemblées » de neurones. Cette plasticité synaptique se met donc

en place dans les processus d'apprentissage et de mémoire, et particulièrement dans le conditionnement Pavlovien. En effet, lors d'un apprentissage SC-SI en conditionnement Pavlovien, les informations en provenance des systèmes sensoriels (système auditif et système nociceptif) convergent vers différents neurones du noyau latéral de l'amygdale. Ainsi, les neurones du LA activés en réponse au SC sont coactivés avec les neurones qui répondent au SI. Selon les théories de Hebb, les connexions synaptiques entre ces deux populations de neurones se renforcent et se facilitent, créant ainsi une mémoire de l'association SC-SI. Ces caractéristiques sont observées après un apprentissage à la fois *in vivo* (Rogan et al., 1997) et *in vitro* (McKernan et Shinnick-Gallagher, 1997). Cette plasticité est donc dépendante de l'expérience et la présentation seule du SC suffit à induire une activation des neurones du LA engagés dans la réponse au SC-SI.

Par ailleurs, il est important de souligner que la plasticité de Hebb dans l'amygdale n'est pas le seul mécanisme qui régule l'activité des neurones lors de l'apprentissage associatif. Même si cette plasticité est indispensable dans l'apprentissage du conditionnement Pavlovien, d'autres mécanismes se mettent en place dans l'amygdale, en particulier au travers de l'activité des neuromodulateurs (voir **Figure 1.4**), produits par le *locus coeruleus* ou le système cholinergique du tronc cérébral et du cerveau antérieur. Activés par l'amygdale au cours de l'apprentissage conditionné, ils sont considérés comme étant les « centres de l'éveil émotionnel », et régulent à leur tour l'activité neuronale des noyaux de l'amygdale au travers de la libération d'acétylcholine ou de noradrénaline (Johansen et al., 2011). Ainsi, c'est grâce à ces différents mécanismes de plasticité synaptique qui interviennent au cours de l'apprentissage conditionné que la mémoire de l'apprentissage SC-SI reste robuste dans le temps.

Au sein des différents noyaux amygdaliens, le noyau latéral est considéré comme le point d'entrée des informations sensorielles (Aggleton, 2000; Ledoux, 1996) qui lui sont transmises au cours de l'apprentissage conditionné et son extinction au travers de l'activité de deux circuits qui coexistent. En effet, le circuit de la peur apprise, tel que décrit par Joseph LeDoux en 1996, est constitué d'un circuit court appelé voie directe, où l'information auditive du SC (dans le cas d'un SC auditif) est transmise au thalamus auditif puis au noyau latéral de l'amygdale. En moyenne, 12 millisecondes sont nécessaires pour qu'une stimulation auditive

atteigne l'amygdale chez le rat, favorisant une réaction rapide et assurant la survie en cas de danger. En parallèle, il existe un circuit long et indirect dans lequel l'information auditive est transmise du thalamus au cortex auditif avant d'atteindre l'amygdale. Un passage de l'information par le cortex au travers de la voie indirecte permet une analyse précise d'une situation, mais prolonge le temps de réaction.

Pendant l'apprentissage de peur conditionnée, les informations sensorielles provenant de la voie directe et de la voie indirecte convergent directement vers les mêmes neurones du noyau latéral de l'amygdale (LA) (Davis, 2000; Pitkänen et al., 1995) qui sont alors spécifiquement activés pour induire une réponse comportementale de peur. L'activité neuronale de l'amygdale au cours de l'apprentissage et de l'extinction de la peur est aussi régulée localement, notamment au travers de l'activité des interneurons présents dans ces sous circuits, mais aussi par les structures associées à l'amygdale telles que les zones prélimbiques (PL) et infralimbiques (IL) du cortex préfrontal médian, et de l'hippocampe ventral et dorsal (voir **Figure 1.4 ; *medial temporal lobe, memory system***).

Il a ainsi été montré que le noyau latéral de l'amygdale était indispensable à l'acquisition de la peur puisque sa lésion altère l'apprentissage de la peur conditionnée (Nader, et al., 2000; Wallace et Rosen, 2001) caractérisée par une diminution de l'expression comportementale et somatique de peur au moment de l'acquisition. D'autre part, le bon équilibre dans la fonctionnalité des interneurons inhibiteurs locaux est essentiel pour moduler les mécanismes de potentialisation à long terme dans les cellules glutamatergiques du BLA. En effet, une délétion spécifique des récepteurs GABA_A dans le LA lors d'une tâche d'acquisition de peur conditionnée provoque chez l'animal des comportements de peur exagérés, caractérisés par une généralisation de la peur à un stimulus non conditionné (Shaban et al., 2006).

Au sein des noyaux amygdaliens, dans le but d'évoquer la réponse comportementale de peur, les neurones du LA activés par l'association SC-SI (Herry et al., 2008) activent spécifiquement les cellules de peur du noyau basal (BA). Ces dernières activent à leur tour le noyau central de l'amygdale (CeA) de manière unilatérale (Amano et al., 2011; Krettek and Price, 1978; Pitkänen et al., 1997; Smith and Paré, 1994). Le BLA, au travers de ses projections sur le CeA, favorise son activité de manière directe par des afférences glutamatergiques ou

indirecte par l'activation des cellules GABAergiques des cellules intercalées (ITC). Les cellules activées du noyau basolatéral de l'amygdale permettent alors de transmettre l'information du SC-SI vers le CeA aboutissant à l'expression comportementale de la peur conditionnée, mais favorise aussi son apprentissage et son maintien en mémoire (**Figure 1.5A**). Cette micro-circuiterie possède des réseaux denses, puisque 100 à 200 collatérales par millimètre d'axone projettent vers les différents noyaux (Smith et Paré, 1994). Les noyaux basomédians (BM) ou basolatéraux (BL) seuls ne sont pas indispensables à l'acquisition et à l'expression de la peur, mais, ensemble, leur inactivation chez l'animal altère drastiquement l'acquisition de la peur, et aussi son expression, puisque l'information n'est plus transmise au CeA (Amano et al 2011).

De part ses rôles dans l'expression de la peur, une lésion du noyau central de l'amygdale n'altère pas l'apprentissage de peur mais altère son expression, avec une atteinte des réactions comportementales, de la libération des hormones pituitaires, de la réactivité à la douleur et des réflexes somatiques (Amorapanth et al., 2000; Helmstetter, 1992; LeDoux et al., 1988; De Oca et al., 1998; Roozendaal et al., 2006). A l'inverse, une stimulation spécifique par optogénétique des terminaisons synaptiques du CeA en provenance du BLA chez la souris provoque une augmentation de la peur associée à un comportement anxieux chez ces dernières, évalué au travers d'une diminution de l'exploration (par le test de *l'open field* qui consiste en l'exposition à un environnement ouvert, dans une arène lumineuse sans possibilité de cachette) et une diminution des temps passés dans les bras ouverts et éclairés lors d'un test de labyrinthe en croix surélevée (Felix-Ortiz et al., 2013). Ces deux tests sont de bons indicateurs des niveaux anxieux chez le rongeur. En effet, dans le milieu naturel ces animaux sont des proies faciles. La luminosité élevée et l'impossibilité de fuir ou de se cacher représentent donc un danger pour leur survie car ils sont potentiellement à vue des prédateurs. Ainsi, une diminution de l'exploration dans un milieu ouvert ou dans les bras ouverts et éclairés du labyrinthe en croix surélevée reflète un niveau d'anxiété élevé.

En parallèle, l'extinction de la peur conditionnée nécessite la mise en place d'une nouvelle mémoire et fait intervenir différenciellement les cellules de l'amygdale ainsi que les structures qui lui sont associées. Cette nouvelle mémoire de l'extinction est mise en place au travers d'une réduction progressive de l'excitabilité des neurones de peur du BLA par l'augmentation de l'activité des synapses inhibitrices intra et extra-amygdaliennes. Alors que

les cellules de peur sont inhibées, on observe une augmentation de l'activité des cellules de l'extinction du BLA (Herry et al., 2008). Lors de la tâche, l'activité des cellules de l'extinction rentre donc en compétition avec celle des neurones de peur activés par l'association SC-SI, et une régulation très fine des synapses inhibitrices sur ce réseau permet de rétablir le niveau d'excitabilité et de diminuer les réponses comportementales et somatiques de la peur conditionnée (Bouton et al., 2006; Myers et Davis, 2007). Activées, les cellules de l'extinction inhibent l'activité du CeA par une voie directe qui active les cellules GABAergiques du CeA, ou indirecte au travers de l'activation des cellules intercalées qui projettent à leur tour vers le CeA **(Figure 1.5)**.

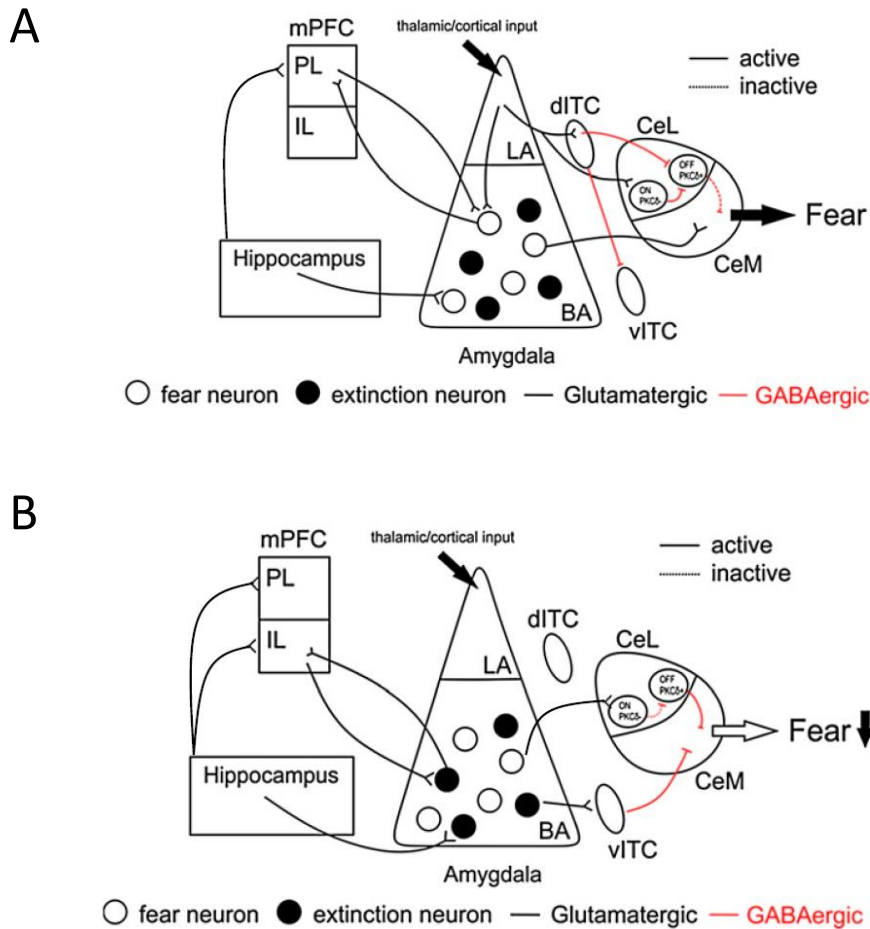


Figure 1.5 : Schéma simplifié représentatif de la fonctionnalité du circuit de la peur lors de l'apprentissage et l'extinction de peur conditionnée. Selon Singewald et al., 2015. (Singewald et al. 2015)

A : Fonctionnalité du circuit APH au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée. Les informations du SC auditif (thalamo/cortical input) et de l'US aversif (non montré) convergent vers les neurones du LA. L'expression comportementale de peur (→ Fear) est mise en place au travers de l'activation des cellules de peur (blanches) du BA et de la désinhibition du noyau central. Cette régulation d'activité est favorisée par le PL et l'hippocampe.

B : Fonctionnalité du circuit APH au cours de l'extinction de peur conditionnée. L'information du SC auditif converge vers les neurones du LA. La diminution de l'expression de peur est mise en place au travers de l'activation des cellules de l'extinction du BA (noires) et de l'inhibition de l'activité du noyau central vers ses voies de sorties. Ces activités neuronales sont favorisées par l'IL et l'hippocampe.

mPFC : Cortex préfrontal médian ; **PL** : Prélimbique ; **IL** : Infralimbique ; **vITC/dITC** : cellules intercalées (ventrales/dorsales) ; **LA** : noyau latéral de l'amygdale ; **BA** : noyau basal de l'amygdale ; **CeL/CeM** : noyau central de l'amygdale (Latéral/Médian).

L'expression de la peur conditionnée et son extinction nécessitent donc une régulation très fine de l'excitabilité des cellules de l'amygdale qui s'organisent en différents circuits qui coexistent et qui modulent ces apprentissages. L'activité de ces circuits est régulée localement grâce à l'activité des interneurons GABAergiques du BLA, en particulier les neurones à parvalbumine (PV), qui sont les cellules GABAergiques principales du BLA et qui sont indispensables pour réguler l'excitabilité des cellules pyramidales du BLA. L'activité de l'amygdale est aussi régulée par les afférences en provenance des zones PL et IL du cortex préfrontal médian (mPFC) et de l'hippocampe ventral (vHPC) qui assurent une analyse fine de la situation en fonction du contexte d'apprentissage et d'extinction dans le but d'induire un comportement adapté. L'apprentissage et l'extinction de la peur conditionnée dépendent donc du fonctionnement intégré de l'amygdale, du mPFC et du vHPC, un circuit que l'on appellera APH.

C. Le circuit de la peur : étude du réseau amygdalo-préfronto-hippocampique (APH).

L'amygdale est bidirectionnellement connectée au cortex préfrontal médian et à l'hippocampe ventral. Ensemble, ils forment un réseau fonctionnel permettant de réguler le comportement lors des différents apprentissages du conditionnement de peur Pavlovien. De nombreuses études de lésions et d'activations du circuit APH ont permis de distinguer les rôles de chacune de ces structures sur l'activité du BLA et sur le comportement de peur, et de mettre en lien les déficits observés dans les troubles de la régulation émotionnelle avec des dérégulations de ce circuit.

Le cortex préfrontal médian (mPFC) est constitué de plusieurs aires dont les zones prélimbiques (PL) et infralimbiques (IL). Ces dernières sont composées à 80-90% de cellules pyramidales excitatrices et de 10 à 20% d'interneurones inhibiteurs qui assurent la régulation de l'excitabilité locale des neurones glutamatergiques (DeFelipe and Fariñas, 1992; Gabbott et al., 2005). Ces cellules sont organisées en couches cellulaires distinctes, de la couche I, la plus superficielle, à la couche VI, la plus profonde. Leurs projections, leurs morphologies ainsi que leurs caractéristiques électrophysiologiques diffèrent en fonction des couches auxquelles elles appartiennent (Caviness, 1975; van Eden and Uylings, 1985; Van De Werd et al., 2010; Yang et al., 1996). Cette organisation laminaire et ces spécialisations cellulaires sont présentes dans toutes les couches corticales du cerveau et sont régulées par des mécanismes génétiques très conservés qui apparaissent au cours du développement cérébral. Au cours de l'expression et de l'extinction de la peur conditionnée chez l'Homme et le rongeur, les cortex prélimbiques et infralimbiques sont différenciellement recrutés (Orsini et Maren, 2008, Orsini et al., 2011) et permettent respectivement d'assurer le maintien de l'expression de la peur et de sa rétention en mémoire, d'une part, et le maintien et la rétention en mémoire de l'extinction, d'autre part (Corcoran et Quirk; 2007; Orsini et al.; 2011; Sotres-Bayon et Quirk; 2010).

L'hippocampe, quant à lui, est une structure appartenant au système limbique. Conservé au cours de l'évolution, il est largement représenté dans la phylogénie et est considéré comme étant le siège anatomique de la mémoire épisodique (Scoville et Milner, 1957). Chez le rongeur, l'hippocampe se distingue anatomiquement et fonctionnellement par sa partie dorsale, qui gère la mise en place de la mémoire et de l'orientation spatiale (Moser et

al., 1995), et sa partie ventrale, qui possède des rôles dans la régulation émotionnelle et qui permet d'intégrer les informations sensorielles environnantes dans le but de les contextualiser (Winocur et Gilbert, 1984). Dans le conditionnement de peur Pavlovien, l'activité de l'hippocampe ventral sur le BLA et le mPFC favorise à la fois l'expression et l'extinction de la peur grâce à la transmission des informations contextuelles qui permettent de discriminer si une situation est potentiellement néfaste ou non, aboutissant à un comportement approprié à cette situation. Par ailleurs, des études de quantification de la protéine c-FOS, un marqueur d'activité cellulaire, ont montré que l'acquisition, l'apprentissage et l'extinction de la peur sont associés à une augmentation de l'expression de c-FOS dans le circuit amygdale – préfrontal : après l'extinction d'une peur conditionnée, il a été montré que l'expression de c-FOS augmentait dans l'IL, les cellules intercalées de l'amygdale et l'hippocampe (Knapska et Maren, 2009), mettant ainsi en évidence les structures impliquées dans la diminution de l'intensité de la peur. En revanche, les animaux ayant reçu un test de *renewal* (retour de peur observé lors d'un retour au contexte initial d'apprentissage après extinction de la peur conditionnée) ont montré une élévation de l'expression de c-FOS dans les structures favorisant l'expression de la peur : le cortex prélimbique, l'hippocampe, et les noyaux LA, BL et CeA de l'amygdale. Notons ainsi que l'hippocampe est actif à la fois pour l'expression et pour l'extinction de peur conditionnée, ce qui reflète bien ses rôles dans la régulation de l'activité de l'amygdale et du mPFC.

1. Etudes d'inhibitions et d'activations

Les premières études de lésions du mPFC chez le rat avant une séance d'extinction ont montré l'apparition d'un retard d'apprentissage de l'extinction de peur avec la nécessité de présentations supplémentaires du SC pour atteindre un niveau diminué de peur semblable à celui des non-lésés (Morgan et al., 1993). Il a donc été initialement conclu que le mPFC était nécessaire pour permettre l'apprentissage de l'extinction de la peur conditionnée. Cependant, ces lésions n'étaient pas restreintes à une aire puisqu'elles altéraient le cortex prélimbique et infralimbique. Plus tard, des études de l'équipe de Greg Quirk ont contredit les résultats obtenus par Morgan *et al.*, puisqu'ils ont démontré chez le rat qu'une lésion de l'IL par électrolyse ou une inactivation par optogénétique ne perturbait pas l'apprentissage de

l'extinction, ni l'expression de la peur au cours de la tâche, mais était plutôt associée à un retour important de la peur lors d'une séance de rappel, consistant en la présentation du SC seul 24h plus tard (Quirk et al., 2000), suggérant plutôt des rôles dans la mise en place de la mémoire de l'extinction et de sa rétention.

Des expériences d'inhibition de l'activité du cortex prélimbique par la tétradotoxine, bloqueur des canaux sodiques, avant une séance de conditionnement chez le rat, ne perturbe pas l'apprentissage conditionné. Cependant, la présentation du SC seul dans le contexte d'apprentissage, 24h plus tard, évoque une plus faible expression de la peur, à hauteur de 80% par rapport au groupe contrôle (Corcoran et Quirk, 2007). D'autres études d'inhibition du PL par du muscimol, agoniste des récepteurs GABA_A, avant une séance d'extinction chez le rat, réduisait l'expression de la peur à hauteur de 60% à la présentation du premier SC sans perturber l'apprentissage ni le maintien en mémoire de l'extinction de la peur (Sierra-Mercado et al., 2011a). Ceci suggère que l'activité du cortex prélimbique ne serait pas essentielle à l'apprentissage de la peur conditionnée, ni à l'apprentissage de l'extinction et de sa rétention mnésique, mais participerait plutôt au maintien de l'expression de la peur conditionnée et de sa rétention en mémoire. A l'inverse, des expériences de micro-stimulations du PL par électrophysiologie *in vivo* chez le rat, de manière simultanée avec la présentation du SC lors de l'extinction ont induit une élévation de l'expression de la peur lors de la présentation du premier SC par rapport aux rats non stimulés, associé à un ralentissement de l'apprentissage de l'extinction et un retour de peur de l'ordre de 93% lors d'une séance de rappel 24h plus tard (Vidal-Gonzalez et al., 2006). Ceci révèle ainsi que l'activation du PL en début de tâche d'extinction réactive la mémoire liée à l'apprentissage de la peur conditionnée et favorise le maintien de l'expression de la peur au SC, aboutissant à un ralentissement de l'apprentissage et de la mise en place de la mémoire de l'extinction et de sa rétention.

Concernant le cortex infralimbique, des études d'inhibition pharmacologique ont montré que l'injection de l'inhibiteur muscimol dans l'IL avant une séance d'extinction chez la souris provoquait des réponses de peur plus élevées en début de tâche, compensées en fin de séance, pouvant être associées à un retour de peur important lors d'une séance de rappel de l'extinction (Do-Monte et al., 2015; Morawska et Fendt, 2012). D'autre part, des études d'inactivation du mPFC par la tétradotoxine (TTX) avant acquisition de l'extinction ont montré

une diminution de l'intensité de la peur chez les rats infusés en début de tâche comparativement aux animaux injectés avec une solution saline, avec un retour de peur spontané lors de la séance de rappel d'extinction (Sierra-Mercado et al., 2006). Cependant, les infusions de TTX n'étaient pas restreintes spécifiquement au cortex infralimbique mais diffusaient à la limite régionale entre le PL et l'IL. La diminution de l'intensité de peur observée lors de la séance d'extinction pourrait être liée à la présence de TTX dans le PL, mais ne serait pas due à un déficit d'apprentissage en soi. Enfin, une inhibition spécifique des projections IL-BLA chez la souris par des techniques chémogénétiques de DREADD après une séance d'extinction ont montré des déficits dans la mise en place de la mémoire de l'extinction avec un retour important de peur lors de la séance de rappel, 24h plus tard (Bloodgood et al., 2018). Enfin, une expérience d'inhibition de l'IL par de l'anisomycine ou de la lidocaïne chez le rat 24h ou 28 jours après un apprentissage conditionné au contexte a altéré l'acquisition de l'extinction dans les deux conditions, suggérant ainsi que l'activité de l'IL était nécessaire dans la mise en place de l'extinction conditionnée après apprentissage aversif récent (24h) ou plus ancien (28 jours) (Awad et al., 2015).

Les expériences d'activation de l'IL pendant l'extinction de peur ont montré qu'une stimulation électrique des neurones de l'IL pendant la présentation du SC induisait chez le rat une réduction de l'expression de la peur tout au long de la séance d'extinction par rapport aux animaux non stimulés, mais qu'elle n'avait aucun effet sur le niveau d'expression de la peur lors de la séance de rappel, comparativement aux non stimulés (Vidal-Gonzalez et al., 2006). De plus, Do Monte et collaborateurs a démontré en 2015 qu'une stimulation des cellules glutamatergiques de l'IL par optogénétique pendant la présentation du SC au cours de l'extinction diminuait l'expression de la peur, mais renforçait également sa mise en mémoire lors du rappel 24h plus tard (Do-Monte et al., 2015). Enfin, des études ont montré qu'une activation pharmacologique de l'IL par la picrotoxine, antagoniste des récepteurs GABA_A, avant l'extinction, abolit totalement la réponse de freezing lors de la présentation des SC, sans modifier cependant l'intensité de la peur lors du rappel de l'extinction 24h plus tard (Chang et Maren, 2011).

Ensemble, ces données suggéreraient que des lésions de l'IL ou des inactivations spécifiques de certaines efférences perturberaient la connectivité fonctionnelle entre l'IL et le

BLA lors de la tâche d'extinction, dérégulant ainsi la connectivité vers le CeA, et altérant plutôt l'expression de la peur. Ainsi, l'activité de l'IL sur le BLA n'est pas nécessaire à l'apprentissage de l'extinction en soi, mais elle l'est dans le maintien de la diminution de l'expression de la peur, ainsi que dans la mise en place de la mémoire de l'extinction et de sa rétention. Les résultats différentiels dans les rôles de l'IL sur l'apprentissage, l'expression de la peur et le maintien en mémoire des informations lors de l'extinction et de son rappel pourraient être expliqués par le type d'expériences réalisées, les protocoles mis en place et les espèces animales utilisées. En effet, les expériences de lésions sont irréversibles. Selon le volume lésé ces lésions peuvent impacter la fonctionnalité de structures voisines. Les manipulations d'optogénétique et d'électrophysiologie, quant à elles, sont réversibles avec une meilleure résolution spatiale et temporelle, et ciblent spécifiquement certains neurones ou certaines projections à des instants précis au cours des différentes phases d'apprentissage. Enfin, les expériences de pharmacologie sont également réversibles et ciblées sur la durée d'une tâche particulière, mais risquent d'impacter l'activité de structures avoisinantes. De plus, selon les protocoles de conditionnement de peur, certains chercheurs utilisent des contextes d'apprentissage et d'extinction différents ou identiques, un nombre d'appariement SC-SI ou de présentations de SC seuls différent, ou utilisent plutôt le conditionnement Pavlovien au contexte qui, comme indiqué précédemment, implique une fonctionnalité différente des structures du circuit de la peur. Enfin, même si les rats et les souris sont très proches phylogénétiquement, il existe néanmoins des différences propres à l'espèce dans la circuiterie cérébrale, ou même au sein d'une même espèce entre différentes lignées d'animaux, comme les rats Sprague-Dawley ou Long-Evans (Chang et Maren, 2010) qui peuvent expliquer les comportements différentiels observés selon les types de protocoles et techniques utilisées.

Ainsi, au travers de ces études, l'hypothèse fonctionnelle serait qu'une augmentation de l'activité du cortex prélimbique est essentielle pour maintenir l'expression de la peur, et la retenir en mémoire, mais n'est pas fondamentale dans la mise en place de son apprentissage. En revanche, l'inhibition de son activité est nécessaire pour permettre de diminuer l'expression de la peur conditionnée au cours de l'extinction. En parallèle, l'activité du cortex infralimbique n'est pas requise pour permettre l'apprentissage de l'extinction, mais elle est essentielle dans le maintien de cette diminution d'expression, et de la mise en place de sa mémoire et de sa rétention.

2. Fonctionnalité du réseau amygdale-préfrontal dans l'apprentissage et l'extinction du conditionnement de peur Pavlovien

L'organisation du cortex en couches cellulaires distinctes permet la formation de connexions spécifiques au sein des structures et entre les structures (Gabbott et al., 2005). En raison du caractère opposé des fonctionnalités du PL et de l'IL, les efférences en provenance des couches II, V et VI du PL projettent vers le BLA tandis que celles de l'IL terminent préférentiellement dans le LA ventral, le LA central et dans le noyau basomédian (McDonald, 1998; McDonald et al., 1996; Vertes, 2004). Cependant, il existe encore à l'heure actuelle des contradictions quant à la localisation des afférences de l'IL sur l'amygdale. Des études ont démontré que ces efférences projetaient directement vers les cellules intercalées de l'amygdale, produisant un *feedforward* inhibiteur vers le CeA (Likhtik et al., 2005; Royer et Paré, 2002), réduisant ainsi son activité et favorisant la diminution de l'expression de la peur. Une hypothèse plus récente serait que l'IL agit à la fois sur l'activité des cellules du BM, du LA et sur les cellules intercalées pour médier l'extinction de la peur conditionnée (Strobel et al., 2015).

Fonctionnellement, au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée les cellules de peur du BLA activées par le SC-SI activent les cellules pyramidales du cortex préfrontal médian situées dans les couches corticales II à VI (Hoover et Vertes, 2007; Krettek et Price, 1977; Little et Carter 2012, 2013). Ces mêmes efférences projettent également une plus faible proportion de collatérales ciblant les interneurons GABAergiques du PL, assurant une inhibition anticipée appelée « *feedforward inhibition* » régulant l'activité du réseau (Gabbott et al., 2006) (**Figure 1.6**). Le cortex prélimbique intègre les informations en provenance du BLA et transmet à son tour via des efférences excitatrices à partir de ses couches II, V et VI vers les cellules pyramidales du BLA (Gabbott et al., 2005; Hoover et Vertes, 2007).

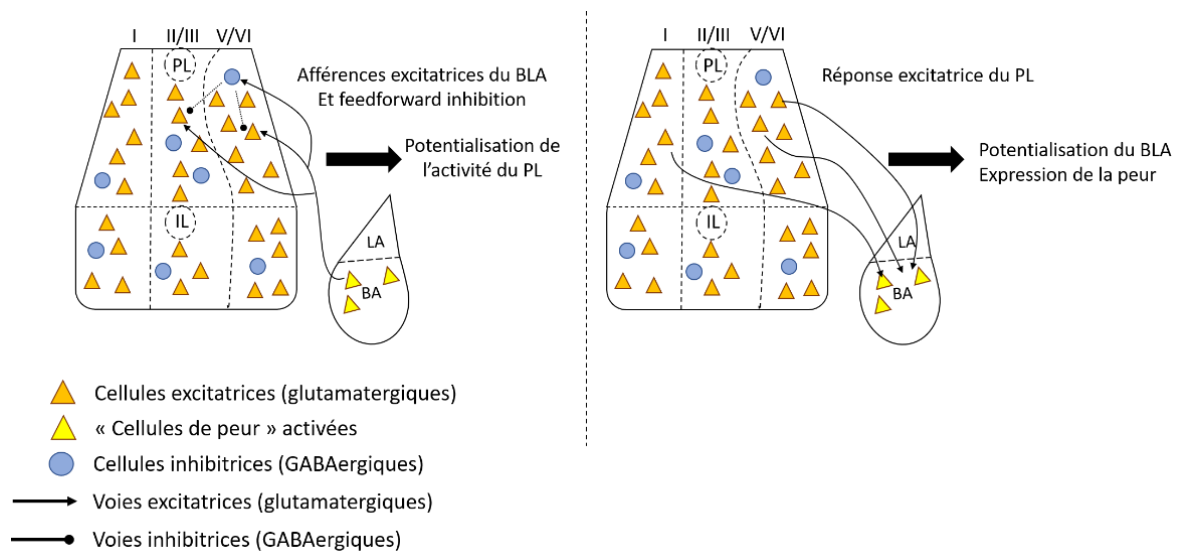


Figure 1.6 : Circuiterie impliquée au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée et de son expression entre le BLA et le mPFC. A gauche est représentée la fonctionnalité entre le BLA et le mPFC au cours de l'apprentissage de la peur conditionnée : les cellules pyramidales du BA activées en réponse à l'association SC-SI activent les cellules pyramidales du mPFC dans les couches II/III et V/VI, avec des collatérales ciblant les interneurons inhibiteurs, produisant un *feedforward* négatif. Dans la finalité, l'activité du BA potentialise celle du mPFC. A droite est représentée la réponse du mPFC suite à l'activité de l'amygdale : le mPFC potentialise l'activité des cellules de peur du BA au travers de ses efférences excitatrices à partir des couches I à VI et favorise le maintien de l'expression de la peur.

I - II/III - V/VI : couches corticales I ; II et III ; V et VI. **PL** : cortex prélimbique, **IL** : cortex infralimbique ; **LA** : noyau latéral de l'amygdale ; **BA** : noyau basal de l'amygdale ; **BLA** : noyau basolatéral de l'amygdale.

L'activité globale du PL est alors augmentée et permet en retour de favoriser l'activité des cellules de peur du BLA, ce qui permet ainsi de maintenir l'expression de la peur conditionnée (Miller et Cohen; 2001; Sierra-Mercado et al., 2011a; Sotres-Bayon et al., 2012). En effet, alors que les cellules de peur du BLA voient leur activité potentialisée lors de la présentation du SC sur une durée d'une centaine de millisecondes (Quirk et al., 1995) les neurones pyramidaux du cortex prélimbique, quant à eux, déchargent pendant toute la durée de la réponse comportementale de freezing (Burgos-Robles et al., 2009). Ainsi, l'amygdale est essentielle à l'induction comportementale de la peur tandis que le cortex prélimbique permet son maintien dans le temps.

Concernant l'extinction de peur conditionnée, des études d'IRM fonctionnel chez l'humain ont montré que l'activité de l'amygdale augmentait en début de tâche d'extinction mais diminuait progressivement au cours de la présentation des SC seuls (Phelps et al., 2004). Ainsi, au cours de l'apprentissage de l'extinction, l'activité globale de l'amygdale diminue progressivement grâce à des mécanismes d'inhibition en provenance du cortex préfrontal et de l'hippocampe (Bloodgood et al., 2018; Milad et al., 2004; Rosenkranz et al., 2003). Les mécanismes qui sous-tendent la réponse comportementale d'extinction de la peur sont donc possibles grâce à une régulation fine du circuit de la peur. En effet, les deux circuits PL-BLA et IL-BLA coexistent et leur activité est opposée lors de la tâche d'extinction de peur, le tout modulé par l'activité de l'hippocampe ventral (vHPC). En effet, le vHPC, et particulièrement le champ ammonien CA1 et le *subiculum*, projette directement sur les noyaux basolatéraux et basomédians de l'amygdale (Canteras et Swanson, 1992; Pitkänen et al., 2000), ainsi que sur les couches corticales I et V du PL et de l'IL. Ainsi, le vHPC régule l'activité des cortex prélimbique et infralimbique et du BLA en associant les informations contextuelles et les informations spatiales (Swanson, 1981). Il permet donc l'intégration et la mise en mémoire de ces informations pour adapter le comportement et diminuer l'intensité de la peur associée au SC. Au cours de l'extinction de la peur, l'excitabilité du circuit PL-BLA serait réduite au travers de mécanismes de rétrocontrôles et de *feedforward inhibition* en provenance du vHPC et de l'IL (Ji et Neugebauer, 2012) et l'excitabilité du circuit IL-BLA serait augmentée grâce aux informations contextuelles transmises par le vHPC, et au par une augmentation de l'activité du PL sur l'IL au travers des couches profondes (Marek et al., 2018). Ainsi, l'activation de l'IL permet de réduire l'excitabilité globale de l'amygdale au travers de l'activation des neurones du BLA engagés dans les processus d'extinction. Ainsi, les « cellules de l'extinction » du BLA permettent de diminuer l'excitabilité globale de la structure et résulte en une inhibition de la transmission de la peur du CeA vers ses voies de sortie. La réduction d'activité du PL et l'augmentation de celle de l'IL favorise donc la diminution progressive de l'expression de la peur lors de la présentation du SC seul dans un contexte donné, avec une activité de l'IL négativement corrélée avec l'intensité de la peur chez le rat (Milad et Quirk, 2002).

En résumé, le PL et l'IL ne seraient donc pas indispensables à l'apprentissage de la peur ou de l'extinction en soi. Le cortex prélimbique activé par les cellules de peur du BLA favoriserait l'expression de la peur, sa rétention, et son maintien en mémoire. Le cortex infralimbique, quant à lui, serait activé par les cellules de l'extinction du BLA et favoriserait la diminution de l'expression de la peur par une modulation indirecte de l'activité du CeA, ainsi que le maintien en mémoire de l'extinction de la peur conditionnée. Enfin, la modulation spécifique de l'activité de ces structures et des régulations très fines de ces microcircuits au cours des différentes tâches est indispensable pour réguler l'expression de la peur (**Figure 1.7**).

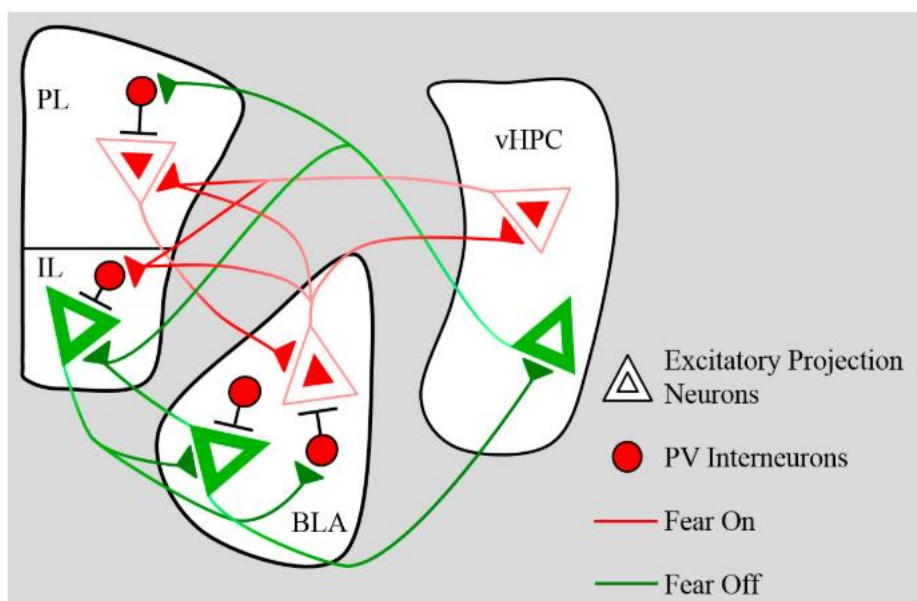


Figure 1.7 : Schéma récapitulatif des afférences et efférences principales du circuit APH régulant l'expression et l'extinction de la peur conditionnée. Selon Zimmermann et al., 2019.

Au cours de l'expression de la peur conditionnée, les cellules excitatrices du BLA (triangle, rouge) « cellules de peur » transmettent les informations du SC-SI à l'hippocampe ventral (vHPC) et au cortex prélimbique (PL) tout en inhibant l'activité du cortex infralimbique au travers d'une excitation des interneurons inhibiteurs à parvalbumine (PV, rond rouge). En parallèle, l'hippocampe ventral transmet les informations contextuelles au PL dans le but d'y intégrer ces informations et d'adapter un comportement, mais aussi d'inhiber l'activité de l'IL au travers de ses interneurons inhibiteurs. Le PL, à son tour, maintient l'expression de la peur au travers d'une transmission excitatrice vers les cellules de peur du BLA. Les interneurons PV du BLA quant à eux inhibent les cellules engagées dans l'extinction de la peur (Vert).

Au cours de l'extinction de la peur, les cellules excitatrices du BLA (vert) « cellules de l'extinction » inhibent l'activité des cellules de peur au travers de l'activation des interneurons PV du BLA. Le circuit qui s'en suit est similaire à celui de l'expression de la peur conditionnée mais vise cette fois-ci à favoriser l'activité de l'IL : les cellules de l'extinction du BLA transmettent les informations du SC à l'hippocampe ventral. Ce dernier transmet à son tour l'information contextuelle au mPFC en inhibant l'activité du PL au travers de ses interneurons PV et d'augmenter l'activité de l'IL au travers de ses cellules pyramidales. En réponse, l'IL permet de maintenir l'activité des cellules de l'extinction du BLA au travers de ses afférences excitatrices.

II. Etudes du comportement de peur au cours du développement du circuit APH

Chez l'Homme et chez l'animal, le développement des différentes structures cérébrales est non linéaire dans le temps et est marqué par de profonds changements qui apparaissent entre la période prénatale et l'âge adulte. Alors que les structures du système limbique mûrissent précocement, les structures corticales et en particulier celles qui sont apparues récemment dans la phylogénie (cortex préfrontal médian ou orbitofrontal chez l'Homme) n'atteignent pas leur pleine maturité avant l'âge adulte (Casey et al., 2005).

Ainsi, les profonds changements structuraux qui s'opèrent au cours du développement cérébral rendent le circuit de la peur fonctionnellement instable et vulnérable aux éléments environnementaux tels que le stress, la maltraitance ou la prise de drogues. Ces éléments altèrent la fonctionnalité du circuit et induisent le développement des pathologies comportementales liées au circuit de la peur à l'âge adulte, telles que l'anxiété, les phobies, la dépression ou les addictions (Andersen, 2003; Andersen et Teicher, 2008; Conger et Petersen, 1984; Costello et al., 2003; Dahl, 2004; Patton et Viner, 2007; Spear, 2000). Il est également connu que l'apparition de ces différents troubles sont couramment existants depuis l'adolescence, et que les troubles anxieux qui émergent pendant l'adolescence ont tendance à se consolider jusqu'à l'âge adulte (Kim-Cohen et al., 2003; Mcardle et al., 1996; Pine et al., 1998). Il est donc essentiel de comprendre comment le circuit de la peur se développe au cours de l'adolescence et quelles en sont les caractéristiques comportementales chez les sujets sains, afin de mieux comprendre comment des déséquilibres d'activité de ces circuits au cours de cette période induisent ou renforcent des pathologies psychiatriques de l'adulte.

L'adolescence est marquée par le début de la puberté, avec la sécrétion des hormones sexuelles qui provoque d'importants changements physiques, hormonaux, cognitifs et émotionnels, et permet de faire la transition entre la dépendance de l'enfance face à ses parents (ou tuteurs) et l'indépendance de la vie adulte (Graber et Brooks-Gunn, 1996; Spear, 2000). Ces différents changements sont largement représentés dans la phylogénie et les mécanismes physiologiques associés sont conservés au cours de l'évolution. En effet, la

puberté se déclenche dans le cerveau au travers de la sécrétion des hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire (comme la GnRH, *Gonadotropin Releasing Hormon*) qui déclenchent à leur tour le développement des caractères sexuels secondaires (augmentation du volume des testicules et ouverture de la voie vaginale chez le rongeur) et la capacité de reproduction (synthèse d'hormones sexuelles par les ovaires et les testicules, production de spermatozoïdes et cycles d'ovulations) (Harris et Levine, 2003; Sisk et Foster, 2004; Zhu et al., 2018). Chez l'animal, cette phase développementale est extrêmement importante pour permettre à un individu de survivre à son environnement, développer ses interactions sociales, se nourrir et se reproduire une fois l'âge adulte atteint.

Chez le rongeur on considère que l'adolescence est comprise entre la fin du sevrage maternel (21^{ème} jour postnatal, PN21) et le début de la maturité sexuelle (PN60) (Smith et al., 2015). En termes de développement cérébral et cognitif, on distingue chez la souris l'adolescence précoce (PN24-35), moyenne (PN37-48) et tardive (PN50-61) (Adriani et al., 2002; Juraska, et al., 2013). Elles peuvent néanmoins varier de quelques jours entre les espèces animales, où les souris atteignent des niveaux de maturation plus précocement que les rats (Clancy et al., 2001; Pinter et al., 2007). Néanmoins, ces trois périodes se distinguent par les étapes de développement des circuits cérébraux et les différentes manifestations cognitives et comportementales qui en découlent.

A. Régulation de la peur chez les adolescents et les adultes

Au cours de la période d'adolescence, les modifications anatomiques et structurelles cérébrales liées au déclenchement de la puberté induisent des changements comportementaux importants avec des altérations cognitives spécifiquement marquées par un manque d'autocontrôle inhibiteur. Ceci induit des caractéristiques comportementales propres à la période d'adolescence, observées chez les humains et chez les animaux, telles que l'impulsivité comportementale, l'augmentation de la réactivité émotionnelle ou encore l'augmentation des prises de risques (Dreyfuss et al., 2014; Guyer et al., 2009; Hare et al., 2008; Mills et al., 2014; Somerville et al., 2010; Steinberg, 2004). Chez les animaux, et particulièrement chez les rongeurs, la période d'adolescence est marquée par une augmentation des périodes de jeu (Van Kerkhof et al., 2013; Panksepp, 1981; Vanderschuren et al., 2016), de l'activité locomotrice et exploratoire, de l'impulsivité comportementale et de l'agressivité, en particulier entre PN30 et PN50 (Spear,, 2000). D'un point de vue évolutif, le développement de ces caractères pendant l'adolescence est essentiel pour favoriser la survie en milieu naturel. C'est au cours de cette période que les animaux doivent développer des caractères qui leur seront favorables pour apprendre à vivre indépendamment, trouver un partenaire, créer une hiérarchie sociale et défendre leur territoire.

Cependant, ces manifestations comportementales sont responsables de l'apparition de pathologies, puisque l'augmentation des réactivités émotionnelles mènent au développement du stress, de l'anxiété ou de la dépression, tandis que la favorisation des prises de risques facilite le développement des comportements dangereux, de la consommation de drogues et d'alcool, et que l'impulsivité comportementale entraîne des troubles agressifs, colériques, voire violents. Concernant le comportement de peur chez l'Homme, l'adolescence est caractérisée par une résistance aux thérapies d'exposition avec de forts taux de rechute. Ces thérapies consistent en la présentation répétée d'une situation anxiogène, dans le but de diminuer sa valence émotionnelle négative et donc de diminuer l'intensité des troubles anxieux. Il s'agit tout simplement de séances d'extinction de la peur avec des séances de rappels, efficaces chez l'Homme adulte, mais pas ou peu chez l'adolescent. Les adolescents présentent donc naturellement une résistance à l'extinction de la peur associée à une mauvaise mémoire de

l'extinction (Baker et al., 2014; Liberman et al., 2006). Également, des études d'IRM fonctionnelle chez l'Homme ont montré une augmentation de l'activité basale de l'amygdale, associée à une augmentation de la réactivité aux émotions négatives, par rapport aux enfants et aux adultes (Somerville et al., 2010). Enfin, des études de conditionnement de peur ont montré l'apparition d'une généralisation de la peur face aux stimuli aversifs chez l'adolescent sain (Lau et al., 2011) et une augmentation de la réactivité de l'amygdale à ces stimuli chez les adolescents présentant des troubles anxieux comparativement aux adolescents sains (Guyer et al., 2009; Monk et al., 2008) serait que l'immaturation du cortex préfrontal et les profonds changements de fonctionnalité du circuit au cours de cette période entraîneraient des déficits dans le contrôle de l'activité des structures limbiques par les structures corticales et favoriseraient donc l'apparition de comportements propres à l'adolescence.

Chez le rongeur, des études réalisées avec différents protocoles de conditionnement de peur ont montré qu'à PN23 le circuit de la peur, et en particulier l'amygdale, est suffisamment mature pour permettre l'apprentissage de peur conditionnée et l'expression d'une réponse conditionnée semblable à celle observée chez les animaux adultes (Barnett et Hunt, 2005; Hunt 1999; Hunt et Richardson, 2007). Les études de Hefner et Holmes en 2007 (Hefner et Holmes, 2007) ont montré au travers d'un protocole de conditionnement de délai que plus les souris étaient jeunes (3 semaines, 6 semaines ou 8 semaines postnatales), plus l'intensité de la peur était importante après apprentissage conditionné, sans néanmoins modifier l'apprentissage de l'extinction de la peur. Pan et ses collaborateurs en 2009 ont réalisé un protocole de conditionnement de peur de délai ou contextuel chez des souris âgées de 4-5 semaines et 9-10 semaines, et ont montré que seules les souris âgées de 4-5 semaines ont présenté une généralisation de la peur à la présentation d'un nouveau son ou d'un nouveau contexte (Pan et al., 2009).

. Concernant l'extinction de la peur, l'équipe de Pattwell et ses collaborateurs en 2012 ont réalisé un protocole de conditionnement au contexte chez trois groupes de souris à PN23 (fin de la période juvénile), PN29-33 (adolescent) et PN70 (adulte) et ont observé un déficit d'extinction de la peur seulement chez les souris adolescentes, même après 4 jours d'apprentissage de l'extinction. Au travers de ces différents protocoles de conditionnement de peur chez la souris, il a donc été montré que les animaux adolescents présentent (1) une

intensité de peur plus élevée à l'apprentissage conditionné, (2) des déficits d'extinction de peur et (3) une généralisation de la peur à un nouveau SC après apprentissage. Ces déficits sont observés au travers de différents protocoles de conditionnement Pavlovien, ce qui suggère que même si les structures du circuit de la peur sont différentes et différenciellement impliquées dans ces types de protocoles, leur immaturité globale altère le comportement de peur quel que soit le type de conditionnement appliqué (Pattwell et al., 2012).

Ces études sur le rongeur sont concordantes avec celles réalisées chez l'adolescent humain, ce qui suggère donc que l'immaturité du circuit de la peur au cours de l'adolescence provoque des déficits de régulation de la peur qui sont conservés entre les espèces. En revanche, contrairement aux études d'IRM fonctionnelles réalisées chez l'Homme (Baker et al., 2014; Liberman et al., 2006), les études sur le rongeur citées précédemment n'ont pas étudié la mémoire de l'extinction au travers d'une séance de rappel. Plusieurs études se sont penchées sur cette question en utilisant des protocoles de conditionnement Pavlovien classiques sur des rats âgés de 24, 35 et 70 jours, correspondant aux périodes juvéniles tardives, adolescentes et adultes. L'équipe de Richardson en 2010 et en 2011 a réalisé chez le rat un protocole d'apprentissage de conditionnement de peur au contexte et ont montré que les animaux juvéniles, adolescents et adultes ne présentaient pas de différences dans l'intensité de peur au cours de la séance d'apprentissage, ni d'altérations dans l'acquisition de l'extinction de peur. En revanche, seuls les animaux âgés de 35 jours présentaient des taux élevés de freezing à la séance de rappel de l'extinction, 24 heures plus tard (Kim et al., 2011; McCallum et al., 2010). Les résultats sur les séances d'apprentissage et d'extinction de peur démontrés par Richardson et ses collaborateurs sont discordants des résultats précédemment illustrés. Comme indiqué précédemment, les différents protocoles de conditionnement de peur ainsi que les espèces animales utilisées pourraient expliquer les différences comportementales observées au cours du développement cérébral. Cependant, il reste évident que l'adolescence est une période de vulnérabilité dans les processus de régulation de la peur, et, ensemble, ces résultats suggèrent que l'adolescence est une période sensible où les stimuli aversifs possèdent une valence émotionnelle plus forte, augmentant l'intensité de peur lors de l'apprentissage et de l'extinction de la peur conditionnée, avec des déficits notables dans la mise en place de la mémoire de l'extinction, associées à des généralisations de la peur à des stimuli qui sont initialement à valence émotionnellement neutre. Les déficits d'extinction ou de rappel de

l'extinction observés naturellement chez l'adolescent pourraient alors se consolider en cas d'état anxieux ou dépressif, ce qui favoriserait le développement des troubles d'anxiété généralisée, de syndrome dépressif majeur, voire de syndrome de stress post traumatique à l'âge adulte.

Une étude de Richardson et ses collaborateurs en 2015 s'est penchée sur le développement du comportement de peur entre l'adolescence et l'âge adulte, et ont comparé les différentes réponses de peur au cours d'une séance d'extinction et de son rappel chez des rats adultes lorsque ces derniers ont reçu un apprentissage conditionné pendant l'adolescence, ou bien chez des rats adolescents ayant reçu un apprentissage conditionné au stade juvénile (PN17) (Baker et Richardson, 2015). Les résultats ont montré que les animaux conditionnés à l'adolescence ne présentaient pas de résistance à l'extinction, ni de déficits de sa mémoire à l'âge adulte. De même, pour les animaux conditionnés juvéniles et testés à l'adolescence. Contrairement aux études présentées jusqu'ici, les animaux adolescents ne présentaient pas de déficits d'extinction ou de sa mémoire si l'apprentissage conditionné s'était déroulé au cours du stade juvénile. En parallèle, les chercheurs ont réalisé un apprentissage conditionné de peur chez des animaux âgés de 34 jours et ont testé l'extinction de peur et sa mémoire 24 heures plus tard (adolescence précoce), à PN40, PN48 (adolescence moyenne), ou PN61 (adolescence tardive). Les résultats ont montré que l'apprentissage de l'extinction et son rappel étaient efficaces seulement pour le groupe testé à l'âge de 61 jours. L'altération de l'extinction et de sa mémorisation serait donc spécifique des animaux ayant reçu un apprentissage conditionné et une extinction de peur au cours de leur période d'adolescence, puisque le groupe conditionné au stade juvénile et testé adolescent ne montrait pas de déficits d'extinction de peur ou de son rappel (**Figure 1.8**).

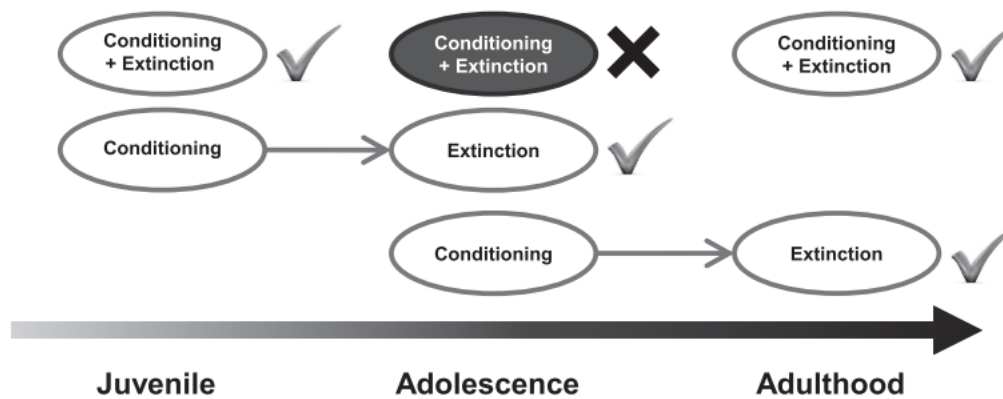


Figure 1.8 : Représentation schématique de la rétention de l’extinction au cours de l’adolescence. Il apparaît que les altérations observées dans la rétention de l’extinction au cours de l’adolescence requièrent à la fois un conditionnement de peur et son extinction pendant l’adolescence. Selon Baker et Richardson, 2015.

D’après ces études sur les processus de régulation de la peur en tâche de conditionnement Pavlovien au cours du développement cérébral, l’adolescence est donc une période très spécifique marquée par une prédisposition à maintenir en mémoire les éléments à valence émotionnelle négatives, avec des tendances à développer des sensibilités plus fortes aux stimuli aversifs associées à des généralisations de la peur. Ces processus semblent communs entre les différentes espèces animales et pourraient avoir un avantage évolutif. En effet, l’adolescence étant marquée chez les animaux par une prise d’indépendance et d’une augmentation de l’exploration dans des environnements inconnus, retenir en mémoire des informations signalant un danger confère à un individu un avantage assurant sa survie lorsqu’il atteindra l’âge adulte.

En raison du développement asynchrone des structures du circuit de la peur, l’immaturité du cortex préfrontal et de l’hippocampe à l’adolescence déséquilibrent l’activité du circuit et ont pour conséquence une dérégulation de l’activité du BLA, favorisant l’expression de la peur et le déficit de mise en place de l’extinction et de sa mémoire. La haute prévalence de troubles anxieux et dépressifs observés chez l’adolescent et maintenus chez l’adulte apparaissent pour la plupart à la suite de traumatismes, de maltraitances, de stress répétés ou d’isolation sociale. Comment des stress subis au cours du développement cérébral

induisent le développement de pathologies liées au réseau de la peur chez l'adolescent, et quelles sont les conséquences chez l'adulte ?

B. Rôle du stress au cours du développement postnatal dans l'apparition de pathologies liées au circuit de la peur.

Le stress, au sens large, est défini comme étant l'ensemble des réponses physiologiques et comportementales face à un danger qui menacerait l'équilibre d'un individu. Ainsi, alors que la peur est une émotion subjective ressentie face à ce danger, la réponse de stress en est le reflet physiologique et comportemental. Par exemple à l'échelle d'une cellule, un stress peut consister en l'application d'un milieu appauvri en nutriments ou en oxygène, néfaste pour la survie de la cellule qui déclenche alors des réponses métaboliques dans le but de s'adapter et survivre dans cet environnement déséquilibré. On parle alors de stress cellulaire. Au niveau d'un organisme, le stress est un mécanisme indispensable à la survie puisque face à un danger, la sécrétion des hormones de stress (adrénaline, cortisol) par l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien (*HHS*) favorise entre autres les réponses somatiques par l'augmentation du rythme cardiaque et de la pression artérielle, de la ventilation pulmonaire, ou de l'oxygénation des tissus musculaires. L'activation de l'axe HHS est associée à une activation du circuit amygdale-cortex préfrontal-hippocampe qui favorise les réactions comportementales de peur (agression, fuite). Tel qu'on l'entend dans le langage commun, le stress est perçu comme étant un sentiment négatif, marqué par des troubles émotionnels (irritabilité, nervosité, voire dépression) et somatiques (tachycardie, sudation) suite à une perturbation de l'équilibre dans l'environnement (conflits, séparation, maltraitance, qualité de vie appauvrie...), qui s'amplifient avec la durée d'exposition à ce stress. C'est pour cela que lors des protocoles de stress utilisés en laboratoire, on confronte les animaux à des dangers potentiels, des isolements sociaux ou des environnements de vie appauvris dans le but de déclencher les réactions comportementales et somatiques de stress et d'en observer les effets aigus ou chroniques au niveau du comportement et/ou de la physiologie du système nerveux central. Le stress est à distinguer de l'état anxieux : l'anxiété est un état émotionnel caractérisé par une nervosité élevée et d'une hypervigilance qui peuvent être – ou non – associés à une situation anxiogène

ou au rappel d'un évènement traumatique. Au niveau physiologique, l'état anxieux induit une sécrétion des hormones de l'axe HHS qui provoquent les mêmes réponses physiologiques que l'état de stress, généralement associés à une sensation de peur pouvant aller de la simple nervosité jusqu'à un état de panique. L'anxiété est donc une réponse physiologique de stress inadaptée, car elle peut apparaître sans la présence d'un danger avéré, et peut être le résultat d'une exposition chronique à un élément stressant.

Afin de reproduire les pathologies liées à la peur observées chez l'Homme adulte, la plupart des protocoles utilisent des expériences de stress aigus qui consistent en des séances de courte durée, répétées sur peu de jours et qui sont capables à elles seules d'induire un stress important et une élévation des taux d'hormones de stress. Ces taux sont cependant rétablis lorsque le stress n'est plus appliqué, mais les conséquences comportementales peuvent être relevées plusieurs semaines après le stress. Les protocoles généralement utilisés consistent en des isolations sociales à court terme, des contentions, ou encore la nage forcée. D'autres études appliquent plutôt des stress chroniques, répétés sur plusieurs jours, voire plusieurs semaines, qui induisent de profonds changements comportementaux, métaboliques et structuraux, durables et potentiellement irréversibles. Pour cela, il s'agit généralement de protocoles d'isolement ou de surpopulation sur plusieurs jours ou plusieurs semaines, des environnements appauvris, ou bien des changements constants de congénères de vie (McEwen 2017, revue) Les protocoles utilisés dans le cas de stress juvénile sont généralement des séparations maternelles transitoires ou prolongées, et il a été plusieurs fois démontré que le stress juvénile favorisait l'apparition de troubles émotionnels, sociaux, et addictifs chez les animaux, avec des caractéristiques morphologiques et des dérégulations du circuit de la peur, semblables à ceux observés chez les humains (Callaghan et Tottenham, 2016)

Parmi les études portant sur le développement des pathologies anxieuses à l'âge adulte, il existe à l'heure actuelle une littérature très fournie concernant les effets du stress juvénile chez l'animal sur le comportement émotionnel à l'âge adulte, ainsi qu'aux effets d'un stress chronique chez l'animal et l'Homme aux périodes adolescentes ou adultes, mais peu d'entre elles se sont spécifiquement penchées sur le stress au cours de l'adolescence et à ses effets à l'âge adulte, et en particulier sur le comportement de peur. Il est désormais admis que le stress chronique, quel que soit le stade de développement cérébral, induit une activation chronique

du système hypothalamo-hypophysaire et une élévation des taux de glucocorticoïdes circulants. Ces hormones, communément appelées « hormones de stress », induisent des dommages importants sur la structure des synapses et des épines dendritiques, et sur la fonctionnalité des structures cérébrales, en particulier celles constituant le circuit de la peur (McEwen et al., 2016). Il a été montré que sous les effets du stress, le système hypothalamo-hypophysaire des adolescents était plus sensible, ayant pour conséquences des sécrétions plus importantes de glucocorticoïdes par rapport aux adultes (Lee et al., 2003; McCormick et al., 2010; Romeo, 2010).

En parallèle, les découvertes des caractéristiques comportementales et neuroanatomiques spécifiques de la période d'adolescence chez l'Homme et chez l'animal ont mené les scientifiques à étudier l'émergence des troubles émotionnels apparaissant au cours de cette période critique dans le but de comprendre comment les maladies psychiatriques émergent au cours de cette période. De manière similaire au stress juvénile, le stress au cours de l'adolescence favorise l'émergence des troubles émotionnels pendant cette période, associés à des altérations de la fonctionnalité du circuit de la peur (Cohen et al., 2013; Malter Cohen, Tottenham, et Casey, 2013). Les études qui se sont intéressées aux conséquences du stress au cours de l'adolescence sur le comportement émotionnel à l'âge adulte chez l'animal ont généralement évalué les troubles comportementaux semblables aux troubles émotionnels et cognitifs qui apparaissent chez l'humain. On trouve notamment des études évaluant le comportement anxieux (*open field*, test du sursaut, labyrinthe en croix surélevé), la mémoire et l'orientation spatiale (Piscine de Morris, labyrinthe radial), la sensibilité aux troubles addictifs (auto-administration d'alcool ou de cocaïne), les troubles des fonctions exécutives (prise de décision, flexibilité mentale, motivation), mais peu d'entre elles se sont spécifiquement intéressées au comportement de peur et à la fonctionnalité du circuit.

1. Etudes comparatives de l'impact du stress chez l'adolescent : Conséquences sur le niveau d'anxiété

Les premières études à se pencher sur les effets du stress au cours de la période d'adolescence du rat sur son comportement à l'âge adulte ont été réalisées au début des années 2000, notamment l'étude de Varty et collaborateurs en 2000 qui ont appliqué un stress chronique par isolement social pendant toute la période d'adolescence du rat (Varty et al., 2000). Les rats étant des animaux grégaires, l'isolement chronique induit une souffrance avec l'apparition de symptômes dépressifs et anxieux (Djordjevic et al., 2012), mais provoque aussi des déficits sociaux à l'âge adulte si les animaux ont été isolés de manière chronique au cours de leur adolescence (Van Den Berg et al., 1999). Ainsi, l'équipe de Varty ont testé l'anxiété des animaux au travers du test de sursaut à l'âge adulte. Le test du sursaut « *startle test* » consiste en la présentation d'un son de forte intensité (« *pulse* », d'une centaine de décibels), entraînant une réponse réflexe de sursaut amplifié par l'état anxieux. En effet, l'anxiété étant définie comme un état de vigilance accrue, l'apparition d'un son fort et inattendu crée une réponse de sursaut dont l'amplitude reflète le niveau d'anxiété. Un second test, le *prepulse inhibition* consiste en la présentation d'un stimulus de plus faible intensité qui précède l'arrivée du son fort. Ainsi, la présentation du premier stimulus inhibe la réponse de sursaut à l'arrivée du pulse, par habituation à la présentation de ce premier son. Ainsi, les animaux testés au test de sursaut présentaient à l'âge adulte une anxiété élevée, traduite par une augmentation de la réponse de sursaut au son fort et par l'absence d'inhibition de sursaut au test du *pre-pulse*. Une autre équipe a réalisé des protocoles de stress variables chroniques pendant la période d'adolescence précoce et testés adultes (Maslova et al., 2002; Maslova et al., 2002a), et ont présenté au test de sursaut une anxiété élevée à l'âge adulte, sans toutefois avoir comparé le comportement obtenu avec des animaux ayant subi un stress plus tardivement dans leur développement.

2. Conséquences du stress à l'adolescence sur l'apprentissage et la mémoire spatiale

Les études d'apprentissage et de mémoire spatiale ont été réalisées par Isgor et collaborateurs en 2004 qui ont montré qu'un stress chronique au cours de l'adolescence chez le rat (PN28 à PN56) n'induisait pas de déficits de mémoire à court terme à l'âge adulte lors d'une tâche comportementale en piscine de Morris, mais altérait la mise en place de la mémoire à long terme, puisque les animaux présentaient des déficits mnésiques lors d'une remise en situation 3 semaines plus tard (Isgor et al., 2004). Dans une seconde étude, Avital et Richter-Levin en 2005 ont également émis l'hypothèse que des stress subis au cours de cette période pourraient entraîner des vulnérabilités à développer des troubles comportementaux à l'âge adulte. Pour cela, ils ont réalisé des protocoles de stress aigus sur des rats adolescents précoces (PN28) et adultes (PN60), suivi de tests comportementaux au même âge ou à PN90, tels que la piscine de Morris, l'*open field* et le test de sursaut. Au test de l'*open field* et au test du sursaut, les animaux stressés à l'âge adulte et testés au même âge (PN60) présentaient une anxiété plus élevée par rapport au groupe adolescent testé à PN28, tandis que les animaux stressés adolescents et testés à l'âge adulte (PN90), présentaient une anxiété plus élevée que n'importe quel autre groupe (Avital et Richter-Levin, 2005). Lors du test de navigation en piscine, les animaux stressés adolescents et testés à l'âge adulte présentaient une augmentation des performances d'apprentissage comparativement aux autres groupes expérimentaux.

Enfin, au cours du test de flexibilité (déplacement de la plateforme dans un autre cadran de la piscine), les animaux stressés adolescents et testés adultes étaient plus performants par rapport aux animaux stressés adultes et testés au même âge. Ces derniers étaient par ailleurs plus performants que les animaux non stressés. Alors que les animaux avaient correctement appris l'emplacement initial de la plateforme, les auteurs de l'étude expliquent que l'augmentation des performances observée chez les animaux stressés au cours de la tâche de flexibilité mettrait en évidence en réalité des déficits dans la mise en place de la mémoire initiale de l'emplacement de la plateforme, rendant ainsi plus facile pour les animaux stressés de trouver l'emplacement alternatif. Cette hypothèse pourrait être cohérente avec l'étude précédente d'Isgor et collaborateurs en 2004 qui ont mis en évidence des déficits de la mise en place de la mémoire au cours de l'apprentissage spatial en piscine chez des rats stressés

adolescents. Cependant, les protocoles de stress utilisés dans l'étude de Avital et Richter-Levin ne sont pas des protocoles de stress chronique. Pour autant, cette étude suggère qu'un stress – même aigu – subi au cours de la période d'adolescence est capable à lui seul d'induire des déficits mnésiques à la piscine de Morris et une élévation de l'anxiété au test de sursaut à l'âge adulte. Enfin, une étude utilisant l'isolement social comme stress chronique au cours de l'adolescence précoce chez le rat (PN21-PN34) n'a pas révélé de déficits d'apprentissage et de mémoire spatiale, mais une altération de l'apprentissage alternatif dans le test de flexibilité à PN60 (Han et al., 2011). En revanche, un stress appliqué seulement à l'âge adulte chez le rat altérerait de façon différente le comportement en piscine puisque leurs performances d'apprentissage étaient diminuées, sans cependant altérer leur mémoire à long terme 3 semaines plus tard.

Les résultats obtenus par ces différentes équipes avec le test de la piscine de Morris semblent contradictoires au regard des altérations obtenues à l'apprentissage, au test de flexibilité ou bien la mise en place de la mémoire à long terme chez des animaux stressés à l'adolescence et testés à l'âge adulte. Ces résultats différentiels peuvent être expliqués par la durée et le type des protocoles de stress utilisés (aigu ou chronique, social ou à stimuli aversifs) ou bien par le protocole comportemental de la piscine de Morris (en piscine classique ou en labyrinthe radial aquatique), ou encore par la différence d'intervalle entre la fin du stress et le début des tests comportementaux (court délai ou long délai). Cependant, ces résultats démontrent que les modifications comportementales observées chez les animaux adultes étaient d'autant plus importantes pour les animaux ayant subi un stress au cours de leur adolescence, plutôt qu'à la fin de leur développement.

3. Conséquences du stress à l'adolescence sur l'anxiété en tâche exploratoire et en comportement de peur

Selon les types de stress et les protocoles comportementaux utilisés, il existe des études dans lesquelles on rapporte des symptomatologies proches de celles observées dans le syndrome de stress-post traumatique (PTSD). A savoir une anxiété élevée, des comportements d'évitement, et un déficit d'extinction de peur pouvant être associé à une généralisation de la peur à un élément qui possède une valence émotionnelle neutre (Goswami et al., 2013).

Au niveau du comportement d'anxiété en tâche d'exploration et d'attrait pour la nouveauté (open field, labyrinthe en croix surélevée) et du comportement de peur, il a été démontré qu'un stress appliqué pendant la première moitié de l'adolescence chez le rat (PN21-PN42), constitué d'un isolement social, provoquait au début de l'âge adulte (PN56) une augmentation du comportement anxieux dans l'open field et dans le labyrinthe en croix surélevé, associée à une élévation des réponses comportementales de peur lors d'une séance d'extinction de peur conditionnée au son (Lukkes et al., 2009).

Des études comportementales utilisant des protocoles de stress aigu répartis sur trois jours chez des rats à l'adolescence précoce (PN27-29) et mi-adolescence (PN33-35) ont permis de tester le comportement anxieux et exploratoire au travers d'un test d'évitement à l'âge adulte (PN60) (Tsoory et Richter-Levin, 2006). Ce test est constitué de 2 compartiments dans lesquels l'animal circule librement, où l'un des deux compartiments est associé à un protocole de conditionnement de peur son-choc et le deuxième compartiment est neutre. Les mesures ici sont les comportements d'évitement du SI : soit les animaux se déplacent dans le compartiment neutre pendant la présentation du SC (évitement, par anticipation), soit au moment du choc (fuite, échappement), soit ils n'évitent pas le choc et restent dans le compartiment de conditionnement (non-réponse). Avant l'apprentissage les animaux circulent librement dans les deux compartiments et le comportement exploratoire est ainsi mesuré. Les résultats ont ainsi montré que les animaux stressés à l'adolescence précoce ou à mi-adolescence présentent au test d'évitement et à l'*open field* à l'âge adulte un comportement exploratoire quasiment inexistant par rapport aux animaux non stressés, soulignant une plus forte anxiété. Au test d'évitement, les taux d'évitement à la présentation du SC étaient diminués

pour les deux groupes, puisque les animaux stressés à l'adolescence précoce ont présenté un comportement qui favorise les « non-réponses » tandis que le groupe stressé à mi-adolescence favorise les comportements de fuite à l'apparition de l'US. Ainsi, les animaux qui ont subi un stress au cours de leur adolescence précoce ou moyenne présentent à l'âge adulte des comportements anxieux différentiels, où les animaux stressés précocement n'apprenaient pas correctement l'association SC-US et montraient un comportement que les auteurs ont qualifié « d'impuissance » face à l'adversité, tandis que les animaux stressés à l'adolescence moyenne présentaient seulement des déficits d'apprentissage SC-SI.

De manière intéressante, d'autres études se sont penchées sur les effets du stress au cours de l'adolescence chez le rat mâle et femelle dans le but de déterminer si le genre sexuel laissait apparaître des différences dans le comportement anxieux et de peur à l'âge adulte. Pohl et collaborateurs en 2007 ont réalisé des protocoles de stress aigu sévère ou de stress chronique moyen au cours de l'adolescence du rat, entre PN23 et PN51, suivi de tests comportementaux à PN72 (Pohl et al., 2007). Dans le protocole de stress chronique, les animaux étaient quotidiennement confrontés à un élément de stress (privation d'eau, lumière stroboscopique, dérégulation du cycle jour/nuit). Dans le protocole de stress aigu sévère, les animaux étaient confrontés deux fois par semaine à une immersion dans l'eau ou une contention forcée. Ainsi, les auteurs comparent les effets de stress prolongés qui dérégulent surtout la qualité de vie des rongeurs, avec des effets de stress aigus sévères qui sont plutôt associés à un danger pour la survie d'un animal. Uniquement pour le groupe ayant subi le stress aigu, les résultats ont montré que seuls les mâles présentaient des niveaux d'anxiété très élevés dans le labyrinthe en croix surélevé. Les femelles, quant à elles, présentaient seulement des comportements d'échappement plus importants, reflétés par une augmentation des sauts à partir des bras ouverts. De plus, seules les femelles du groupe ayant subi un stress aigu présentaient à l'âge adulte des comportements de type dépressif au cours d'une tâche d'auto-administration d'eau supplémentée en sucrose. En parallèle, une étude de Toledo-Rodriguez et Sandi en 2007 ont appliqué un stress aigu au cours de l'adolescence (PN28-30) chez le rat mâle et femelle (Toledo-Rodriguez et Sandi, 2007). Pendant trois jours, les animaux étaient placés 25 minutes dans une cage dans laquelle était déposé un tissu imbibé de l'odeur d'urine de renard, un prédateur naturel du rongeur. Cette séance était suivie de 25 min d'exposition à une plateforme surélevée et illuminée avec une forte intensité (500-550 lux) dans laquelle les

animaux ne pouvaient ni fuir, ni se cacher, entraînant ainsi des réactions de stress. Les résultats ont montré que seuls les mâles présentaient à l'âge adulte (PN85-86) un déficit d'extinction de la peur conditionnée au son. En revanche, lorsque les animaux étaient testés à l'adolescence (PN31-32), les mâles présentaient une élévation de l'intensité de peur lors d'un apprentissage conditionné simple au son, tandis que les femelles adolescentes présentaient ces mêmes caractéristiques uniquement au cours d'un apprentissage conditionné au contexte, sans différence avec les non-stressées au cours de l'extinction de peur. Toutefois, les auteurs n'ont pas comparé le comportement des femelles stressées avec celui des mâles stressés, qui pourrait révéler des différences dans la régulation du comportement de peur en fonction du genre et du protocole comportemental. Ces résultats suggèrent que le stress au cours de l'adolescence induit des déficits comportementaux différentiels à l'âge adulte par rapport à des stress subis à la fin du développement cérébral, et ce, de façon différentielle entre les mâles et les femelles.

Aparté sur les différences sexuelles dans le comportement émotionnel au cours du développement.

Comme nous le savons, les études sur l'animal de laboratoire portent majoritairement sur les animaux mâles, initialement dans le souci d'éviter les fluctuations hormonales des animaux femelles risquant de perturber les mesures comportementales, hormonales ou de biologie moléculaire. Or, il est désormais essentiel d'intégrer dans nos études de recherche scientifique une part d'animaux femelles, d'autant plus que la majorité des pathologies liées à la peur chez l'humain montre une prévalence plus élevée pour les femmes que pour les hommes. C'est notamment le cas pour les troubles anxieux généralisés, les troubles paniques, le syndrome de stress post traumatique, les phobies, la dépression, les troubles bipolaires et les personnalités 'borderline'. Les études comparatives du comportement de peur et de sa régulation entre les mâles et les femelles montrent des différences liées au genre, y compris dans les cas pathologiques. Il serait donc essentiel de comprendre en quoi le développement cérébral diffère entre les mâles et les femelles afin de mieux comprendre l'émergence des pathologies relatives à la peur, dans le but de les prévenir et les traiter.

Enfin une étude de Skelly et collaborateurs en 2015 ont montré qu'une isolation sociale pendant toute la durée d'adolescence du rat a induit à l'âge adulte une augmentation de l'anxiété au labyrinthe en croix surélevée et des déficits d'extinction de la peur conditionnée dans le paradigme de sursaut potentialisé par la peur (« *fear-potentiated startle* ») (Skelly et al., 2015). Ce protocole est utilisé après apprentissage conditionné simple (ici, une lumière

associée à un choc électrique) dans lequel on présente de manière aléatoire le SC seul et un son de forte intensité communément utilisé pour provoquer le sursaut. Les résultats ont ainsi montré que l'acquisition de la peur conditionnée n'était pas altérée pour les animaux isolés chroniques, et que leur réponse de sursaut 24h après apprentissage était inchangée. Enfin, les animaux étaient confrontés à 3 séances d'extinction séparées de 24h suivies d'un test de sursaut potentialisé par la peur. Alors que les séances d'extinction n'ont pas révélé de différences entre les groupes, les animaux isolés socialement pendant l'adolescence présentaient toujours des taux de sursauts élevés, suggérant ainsi que les animaux stressés chroniques présentaient une résistance à l'extinction de la peur lors de la présentation seule du SC après l'extinction. De plus, au cours d'un test d'auto-administration d'alcool, seuls les animaux isolés à l'adolescence consommaient préférentiellement de l'alcool de manière compulsive et excessive. Ce comportement est apparenté au *binge drinking* chez l'humain, qui consiste en la consommation excessive d'alcool sur des durées courtes, régulièrement observée chez les adolescents et prédisposant à développer à l'âge adulte des troubles alcooliques (Carnicella, 2015).

En résumé, à l'heure actuelle les études qui mesurent les effets du stress aigu ou chronique au cours de la période d'adolescence du rat sur le comportement adulte portent habituellement sur les mécanismes d'apparition des troubles anxieux, dépressifs ou addictifs (**Figure 1.9**). Il reste encore de nombreux points à élucider sur les effets du stress au cours de l'adolescence et l'émergence de symptômes proches du PTSD à l'âge adulte et les effets du stress sur la fonctionnalité du circuit de la peur au cours du développement. En effet, selon les stress appliqués (stress social, appauvrissement de l'enrichissement, danger pour la survie induit par la nage forcée ou l'odeur d'un prédateur), leur durée (aiguë ou chronique), le genre sexuel de l'animal ainsi que l'âge auquel les stress sont appliqués (adolescence précoce, tardive), les structures du circuit de la peur sont différenciellement recrutées et leur implication dans le développement du PTSD pourrait ainsi dépendre de ces différents types de protocoles. Il reste ainsi à comprendre quels types de stress et quelles altérations du circuit induisent spécifiquement l'apparition des troubles anxieux généralisés ou du PTSD à l'âge adulte.

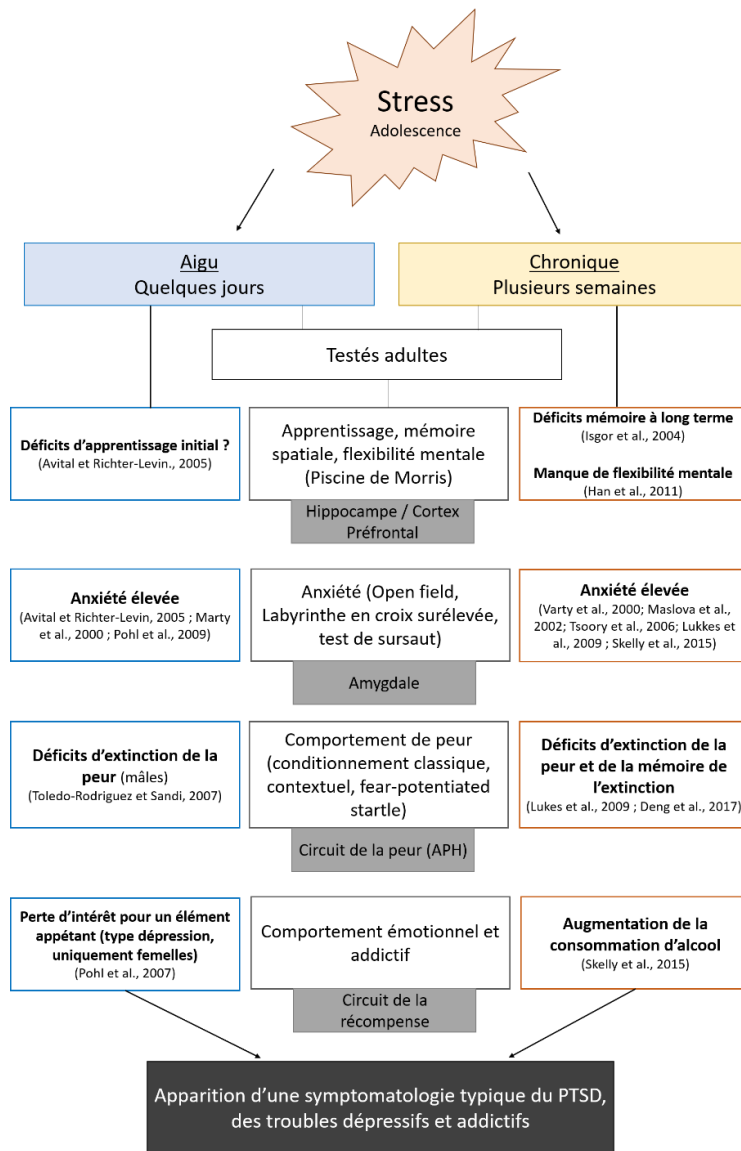


Figure 1.9 : Schéma récapitulatif d'études comportementales évaluant les effets du stress au cours de l'adolescence du rat sur le comportement mnésique, anxieux, et émotionnel à l'âge adulte.

Les altérations comportementales observées sont intimement liées à la fonctionnalité de nombreuses structures cortico-limbiques, en particulier celles appartenant au circuit de la peur ou modulées par l'activité de ce dernier. Les symptômes qui apparaissent sont semblables à ceux observés dans le PTSD chez l'humain, particulièrement après application d'un stress chronique, et de manière différentielle entre les mâles et les femelles.

Notons que le test du sursaut (classique ou avec *pre* pulse) fait intervenir un circuit dont nous n'avons pas discuté. Constitué des noyaux caudés, de l'olive supérieure et de la formation réticulée du tronc cérébral, leur activité excite les motoneurones et élicite la réponse comportementale réflexe de sursaut. Cependant, l'amplification de la réponse au sursaut est liée à l'état anxieux, lui-même engendré par une dérégulation de l'activité de l'amygdale ou du cortex préfrontal (Koch et Schnitzler, 1997) et a donc été placé dans la catégorie « anxiété - amygdale » de ce schéma.

Fonctionnellement, comme nous allons le voir dans la prochaine partie, l'hippocampe n'étant pas pleinement mature avant la moitié de l'adolescence chez le rongeur, une perturbation de sa fonctionnalité par une exposition au stress pendant le développement pourrait favoriser les déficits de mémoire à long terme observés chez les animaux adultes lors des tâches en piscine. De manière similaire, le cortex préfrontal médian subissant de nombreuses modifications structurelles au cours de l'adolescence pourrait voir son activité perturbée, se consolidant à l'âge adulte et entraînant par exemple les troubles de flexibilité mentale observés dans une tâche de changement de règle. Ensemble, ils formeraient un circuit dont l'activité serait déséquilibrée, ne permettant plus de réguler l'activité de l'amygdale, elle-même potentiellement modulée en raison de l'exposition au stress. En conséquence, l'amygdale serait alors plus sensible aux éléments possédant une valence émotionnelle négative, provoquant *in fine* des expressions exagérées de la peur, observées notamment au cours des tests d'anxiété et d'extinction de peur conditionnée, semblables à celles observées dans les syndromes de stress post-traumatiques chez l'Homme.

En conclusion, le circuit de la peur est constitué de plusieurs structures corticales et limbiques extrêmement conservées, dont la bonne fonctionnalité est fondamentale pour permettre à un individu d'adapter son comportement face à un danger potentiel. L'immaturation fonctionnelle du circuit de la peur au cours de la période juvénile et adolescente est directement liée au développement non linéaire des structures qui le constituent. Cette asynchronie développementale crée donc des comportements typiques chez les adolescents humains et animaux, et rend les individus vulnérables à différents éléments environnementaux potentiellement stressants. De ce fait, on observe une propension importante au développement de troubles comportementaux associés à une dérégulation du circuit de la peur à l'âge adulte et à l'apparition de pathologies anxieuses, dépressives ou au syndrome de stress post-traumatique.

Dans cette première partie nous nous sommes penchés sur la fonctionnalité du circuit de la peur au cours du développement et ses manifestations comportementales dans des conditions saines et pathologiques, mais il est désormais fondamental de comprendre comment les structures du circuit se développent et interagissent entre elles (Partie 2), et quelles sont les altérations structurelles et cellulaires associées aux pathologies liées à la peur au cours du développement cérébral (Partie 3).

PARTIE 2 : DEVELOPPEMENT STRUCTUREL ET
FONCTIONNEL DU CIRCUIT APH ET
CARACTERISTIQUES CELLULAIRES

La notion de maturité d'une structure peut être considérée sous plusieurs points de vue :

(1) Localement, lorsque toutes les cellules la composant ont terminé leurs phases de multiplication et de prolifération pour former des réseaux fonctionnels stables et doués de plasticité à court et long terme, régulées par des interneurons inhibiteurs locaux qui apparaissent progressivement ; (2) structurellement, lorsque les processus d'élagage synaptique, de raffinement des épines dendritiques et de myélinisation au sein de la structure et entre les structures se stabilisent ; (3) au niveau fonctionnel et comportemental, on pourrait considérer qu'une structure est mature lorsque son activité est suffisante pour induire le comportement auquel elle est généralement associée. Cependant, une structure cérébrale n'est jamais isolée en soi et n'agit pas indépendamment des autres structures. Malgré sa maturité locale et la stabilité de son activité intrinsèque, l'immatunité des structures du circuit auquel elle appartient rend instable l'entièreté du réseau, et provoque des déséquilibres d'activité laissant apparaître des manifestations comportementales immatures.

Au sein du circuit de la peur, nous savons désormais chez le rongeur que l'amygdale atteint sa maturité fonctionnelle autour de PN10, suivi de l'hippocampe à PN35 puis du cortex préfrontal entre PN70 et PN90. Ces trois périodes de développement coïncident tout particulièrement avec les âges clés du développement cérébral du rat, à savoir : le stade juvénile, l'adolescence, et l'âge adulte. Cette asynchronie développementale du réseau de la peur laisse apparaître des caractéristiques comportementales propres à ces différents âges dont les effets sont particulièrement notables au cours de l'adolescence, comme nous avons pu le démontrer dans la partie précédente.

A. Généralités sur les évènements cellulaires et structurels apparaissant entre la période prénatale et l'adolescence

Chez le rat, les différentes étapes de développement cérébral sont semblables à celles de l'Homme. Chez le rat, les premières structures embryonnaires qui formeront le cerveau apparaissent à 11 jours embryonnaires (E11). Le thalamus, l'hippocampe et l'amygdale sont rapidement colonisés par des cellules progénitrices qui apparaissent entre E13 et E16, suivi du néocortex entre E16 et E18. (Livre ; John Rubenstein et Pasko Rakic (éditeurs) ; Comprehensive developmental neuroscience : Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS; 2013). Ces proliférations cellulaires se poursuivent jusqu'à la 2^{ème} semaine de vie postnatale du rat, où les cellules constituant les différentes structures achèvent leur spécialisation avec des connexions spécifiques qui mûrissent jusqu'à l'adolescence et l'âge adulte. Cependant, le développement de ces structures se poursuit après la naissance (fin de gestation à 21 jours chez le rat) où le rat atteint une organisation cérébrale semblable à celle de l'humain à sa naissance autour de 12-13 jours en postnatal (Rice et Barone, 2000; Romijn et al., 1991). Au cours de cette période embryonnaire et jusqu'à la première semaine de vie chez le rongeur, les différentes structures du cerveau se développent grâce à des processus de neurogenèse et de prolifération, suivis de migrations cellulaires, de spécialisations, de synaptogenèse, d'apoptose et de myélinisation, le tout dans des séquences temporelles et régionales distinctes, spécifiques et conservées. Peu avant la naissance chez l'Homme, et à deux semaines de vie postnatale chez le rat, des mécanismes d'apoptose sont mis en place afin d'éliminer 50 à 70% des cellules, dont les neurones qui ne possèdent pas de connexions spécifiques et les cellules progénitrices qui n'ont pas terminé leur spécialisation. Ce processus physiologique permet de réguler l'efficacité et la fonctionnalité des circuits pendant leur développement (Bandeira et al., 2009; Buss et al., 2006)

A la suite de ces processus d'apoptose, le cerveau subit un élagage massif de ses épines dendritiques et de ses synapses afin d'éliminer les connexions exubérantes et non fonctionnelles, et d'équilibrer la balance excitation/inhibition au sein des structures dans le but de former des réseaux stables et équilibrés. Ces événements apparaissent peu après la naissance chez l'Homme et autour de 3 semaines de vie chez le rat. Alors que les connexions non spécifiques sont éliminées par élagage, les neurones continuent leur croissance et augmentent en volume, tandis que la glie poursuit son développement et sa spécialisation. Malgré les morts cellulaires et les élagages apparaissant dans les 4 premières semaines de vie du rat, le volume et la masse totale du cerveau augmente drastiquement entre PN2 et PN60, ou 80% de cette augmentation apparaît entre PN2 et PN25 de manière structure-spécifique. En effet, il a été observé que certaines structures comme l'hippocampe ou le bulbe olfactif poursuivent leur croissance et augmentent en volume jusqu'à l'âge adulte, tandis que le cortex cérébral perd une grande partie de sa masse entre PN25 et PN60, au moment de l'adolescence du rongeur. D'autres études ont montré que le volume de l'amygdale chez le rongeur augmentait à partir de PN7, puis à partir de l'adolescence de PN20 à PN35, avant de diminuer de volume entre PN35 et PN90 (Pan et al., 2009; Rubinow et al., 2009). A partir de PN60 et jusqu'à PN90, la masse globale du cerveau reste stable et les processus de myélinisation se terminent, traduisant la fin du développement cérébral (Bandeira et al., 2009).

Comme indiqué précédemment, le circuit de la peur possède un développement non linéaire de ses structures, avec des maturités fonctionnelles distinctes apparaissant entre le stade juvénile et l'âge adulte. Le développement des cellules excitatrices et inhibitrices au sein de chacune de ces structures est également non linéaire dans le temps, et le développement asynchrone des différentes projections intra et inter-structures résulte en des fonctionnalités différentielles selon l'âge et des manifestations comportementales distinctes. Ces différentes étapes de développement cérébral sont conservées entre les espèces (Homme, singe, rongeur) et sont modulées par des facteurs externes acquis (environnement, substances chimiques, contact avec des pathogènes) et des facteurs internes innés (bagage génétique, régulation de la transcription des gènes, hormones). Dans le cas d'un développement cérébral normal (non pathologique), le fonctionnement intégré des facteurs internes et externes permet de

construire une structure cérébrale stable et équilibrée, résultant en des comportements adaptés et nécessaires à la survie et au bon fonctionnement d'un individu adulte. Le développement pré- et post-natal chez l'Homme et le rongeur a été largement étudié, puisque, selon les hypothèses récentes, les maladies neurodéveloppementales telles que la schizophrénie ou l'autisme seraient des pathologies liées à des déficits apparaissant au cours du développement cérébral, en particulier lors des phénomènes d'apoptose et d'élagage synaptique qui seraient déficitaires, entraînant l'apparition de connexions en surplus et aberrantes qui perturbent la fonctionnalité globale du cerveau.

1. Projections du BLA vers le cortex préfrontal

Les premières études de traçage antérograde des projections entre l'amygdale et les structures corticales chez le rongeur au cours du développement ont été réalisées entre 1996 et 2002 par les équipes de Verwer, Bouwmeester et Cunningham (Bouwmeester et al., 2002; Cunningham et al., 2002a; Verwer et al., 1996). Bouwmeester et collaborateurs en 2002 ont étudié les projections entre l'amygdale, le cortex, le noyau accumbens et le thalamus entre PN5 et PN26 chez le rat et ont montré des patterns d'apparition et de maturation de projections spécifiques en fonction des structures ciblées. Le développement des projections entre le BLA et le mPFC sont représentées dans le **Tableau 1.1**.

	BLA →	PN5-PN7	PN7-PN9	PN9-PN11	PN11-13	PN 13-26
PFC →	Couche I		I ←	I ← 35 %	I ← 45 %	I ← 30 %
	Couche II		II ←	II ←	II ←	II ←
	Couche III		III ←	III ←	III ←	III ←
	Couche V		V ←	V ← 60 %	V ← 55 %	V ← 60 %
		Cônes de croissance immatures, projections diffuses.	Boutons synaptiques formés. Seule V pour IL.	Innervation en pattern bilaminaire.	Bilaminaire, homogénéisation entre les couches Pattern Adult-like + denses PL	Bilaminaire, Bien organisé Volume mPFC Adult-like

Tableau 1.1 : Représentation du développement des projections entre le BLA et le mPFC chez le rat entre PN5 et PN26. A partir de la publication de Bowmeester et al., 2002. Les couches corticales du cortex préfrontal sont représentées dans la colonne de gauche, de la couche I (la plus superficielle) à la couche V (la plus profonde). Les fourchettes d'âges auxquels se développent des projections spécifiques du mPFC en provenance du BLA sont indiqués dans l'en-tête des colonnes. Les pointes des flèches indiquent les couches corticales recevant ces projections. La nature des modifications cellulaires associées est indiquée en bas des colonnes.

L'amygdale projette ses premières fibres vers le mPFC entre PN5 et PN9, bien avant que la structure seule ne soit fonctionnellement mature. En effet, des études de conditionnement de peur olfactif chez le rat juvénile ont montré que ces derniers sont capables d'apprentissage de peur conditionnée à partir de PN10, avec un comportement d'évitement prononcé d'un SC olfactif après conditionnement (Moriceau et Sullivan, 2006). On peut donc considérer chez le rat que la fonctionnalité de l'amygdale dans l'apprentissage et l'expression de la peur conditionnée apparaît rapidement dans la vie post natale, bien avant le sevrage maternel qui apparaît à PN21.

Les premières efférences de l'amygdale sont diffuses et immatures, et innervent en priorité les couches les plus profondes du mPFC (Tableau 1.1, entre PN5 et PN11), avec des premières branches qui se dirigent vers les couches profondes et superficielles du PL, et uniquement les couches profondes de l'IL (Table 1, PN7-PN9 ; Bouwemeester et al., 2002 ; Cunningham et al., 2002). Plus précisément, on suppose que la partie postérieure de l'amygdale

innerve à la fois les couches V et II du mPFC, tandis que sa partie antérieure cible préférentiellement la couche II (Krettek et Price, 1977), ce qui peut donc aboutir à des fonctionnalités différentes des projections BLA-mPFC en fonction de l'axe antéro-postérieur. Alors que l'amygdale seule est fonctionnellement mature à PN10, on observe que ses projections dans le mPFC se restreignent et s'organisent spécifiquement dès PN11 dans les couches I, II et V pour atteindre un pattern de bilamination de type adulte dès PN13, avec une densité plus importante pour le PL que pour l'IL. Quel que soit le stade de développement étudié, les auteurs n'ont pas détecté de projections du BLA vers la couche III du mPFC.

Entre PN13 et PN26, qui correspondent à l'âge juvénile et au début de l'adolescence du rat, on observe une maturation de ces projections BLA-mPFC avec une croissance majoritairement ipsilatérale et une dominance pour les couches profondes par rapport aux couches les plus superficielles. L'organisation bilaminaire des fibres du BLA vers le mPFC est mature plus précocement pour les projections vers le PL par rapport à l'IL (Verwer et al., 1996 ; Bouwemeester et al., 2002). Ces résultats suggèrent donc que les projections BLA-PL atteignent des niveaux de maturité fonctionnelle plus précocement que les projections BLA-IL, ce qui concorde avec les résultats comportementaux observés dans la régulation de la peur des animaux adolescents. En effet, l'immaturation des projections BLA-IL à l'adolescence pourraient participer aux déficits d'extinction.

En parallèle, les projections du BLA vers le thalamus et le noyau accumbens atteignent rapidement des niveaux de maturité semblables à ceux retrouvés chez les adultes, et ne subissent que très peu de modifications entre PN7 et PN26 (Verwer et al., 1996 ; Bouwemeester et al., 2002). Ces différences dans le développement et la maturité des projections entre les différentes structures associées au BLA sont intimement liées au développement propre de ces structures. En effet, le thalamus et le noyau accumbens possèdent rapidement une structure fonctionnellement mature et stable, tandis que le cortex préfrontal subit encore d'importants changements structuraux à PN26. Par exemple, il a été démontré chez le rat que la distribution laminaire du mPFC est distinguable dès PN6, mais encore fonctionnellement immature puisque la cytoarchitecture s'affine jusqu'à PN18, âge auquel la largeur des couches, les proportions de cellules entre les différentes couches et l'organisation cellulaire sont semblables à celles

retrouvées chez l'adulte à partir de PN24 (van Eden et Uylings, 1985). Les fibres du BLA projettent donc vers le mPFC bien avant qu'il ne subisse des réorganisations laminaires, expliquant les changements majeurs de connectivités apparaissant entre PN5 et PN26.

L'équipe de Cunningham en 2002 a également étudié le développement des projections BLA-mPFC au cours du développement cérébral du rat juvénile jusqu'au rat adulte, entre PN6 et PN120 (Cunningham, 2002). Alors que les résultats obtenus entre PN6 et PN25 concordent avec ceux de l'équipe de Bouwemeester, les études de l'animal adulte ont montré que la densité des fibres dans le PL (appelé ici *Anterior Cingulate Cortex*, pour son homologie avec l'Homme) et dans l'IL augmente plus rapidement dans la couche V, et ce, jusqu'à PN120. En revanche, le développement des fibres dans la couche II du PL et de l'IL augmente progressivement jusqu'à atteindre un niveau plateau à PN45 (Cunningham et al., 2002). Il a été également montré que les cellules pyramidales des couches II et V du cortex préfrontal médian projettent vers le mPFC contralatéral, permettant une communication entre les deux hémisphères (Hirai et al., 2012; Otsuka et Kawaguchi, 2011).

Enfin, Cunningham et collaborateurs en 2002 ont évalué la nature des connexions des projections du BLA vers le cortex préfrontal, et ont montré une augmentation significative des contacts axodendritiques entre PN16, PN25, et PN45, concordant avec des études précédentes qui ont révélé que la majorité des projections axoniques du BLA forment des contacts avec les épines dendritiques des cellules du mPFC (Bacon et al., 1996). Ces types de contacts sont excitateurs et permettent à la fois d'exciter localement les cellules du mPFC et de mettre en place les mécanismes de *feedforward inhibition*. A l'adolescence, les fibres en provenance du BLA qui ne possèdent pas de contacts sont éliminées, et celles qui possèdent des contacts avec les dendrites des cellules pyramidales du mPFC se consolident et mûrissent jusqu'à l'âge adulte. Cette augmentation et maturation progressive des synapses axodendritiques au cours de l'adolescence suggère que la fonctionnalité interne du mPFC est en pleine maturation et que la structure acquiert progressivement des capacités de *feedforward inhibition* grâce à ces transmissions excitatrices en provenance du BLA.

La croissance des projections entre le BLA et le cortex préfrontal est donc progressive de l'âge juvénile à l'âge adulte, de manière différentielle selon la structure corticale (PL ou IL) et selon les couches cellulaires (II et V). Le développement de ces projections est concomitant avec les réorganisations cellulaires apparaissant dans le cortex préfrontal au moment de l'adolescence (apoptose, élagages, myélinisation et démyélinisations, raffinements...), rendant le réseau fonctionnellement immature et instable, potentiellement sensible aux éléments environnementaux. Le développement global des projections BLA-mPFC est représenté dans la **Figure 1.10**.

2. Développement des projections du cortex préfrontal vers le BLA

Le cortex préfrontal est l'une des dernières structures cérébrales à atteindre sa maturité. Chez l'Homme, on sait que les épines dendritiques et les synapses locales des neurones pyramidaux du mPFC prolifèrent jusqu'à atteindre un pic de densité à la moitié de l'enfance. Au cours de l'adolescence, des mécanismes d'élagage des synapses et des épines dendritiques s'opèrent, où la moitié des épines du cortex préfrontal sont éliminées jusqu'à atteindre un plateau à l'âge adulte (Huttenlocher, 1979; Petanjek et al., 2011). A partir de là, la densité des épines et des synapses reste stable au cours de la vie adulte.

Nous savons que, chez le rat et la souris, les neurones du mPFC projettent vers le BLA entre PN10 et PN30 à partir de la même couche corticale qui reçoit les projections du BLA vers le mPFC, à savoir les couches corticales II et V (Arruda-Carvalho et al., 2017). Cependant, il a été montré chez la souris que des neurones originaires de la couche III du cortex infralimbique projettent vers le noyau basolatéral de l'amygdale (Ferreira et al., 2015), alors que les projections réciproques BLA – Couche III de l'IL n'ont pas été démontrées, révélant ainsi la formation de projections spécifiques entre les deux structures.

Des études de traçage rétrograde chez le rat au cours du développement ont également montré que les fibres du mPFC aboutissant dans le BLA se développent jusqu'à la moitié de l'adolescence avant de diminuer en densité entre PN45 et PN90 (Arruda-Carvalho et al., 2017; Cressman et al., 2010a; Cressman et al., 2010b), grâce à des mécanismes d'élagage

des synapses et des dendrites qui éliminent les fibres ne possédant pas de connexions spécifiques (**Figure 1.10A**). De manière intéressante, et contrairement aux projections du BLA vers le mPFC, le cortex préfrontal subit au cours de l'adolescence à la fois un élagage de ses fibres mais aussi une diminution du nombre total de cellules qui projettent vers le BLA, spécifiquement entre la fin de l'adolescence à PN45 et l'âge adulte à PN90 (Cressman et al., 2010a-b). Ces mécanismes permettent de réguler le nombre de projections et la densité des fibres aboutissant au BLA, mais la raison de la perte des neurones spécifiques du mPFC pendant l'adolescence reste cependant à éclaircir. Également, il a été montré que les cellules pyramidales de la couche II du mPFC projettent vers le mPFC contralatéral. Ce dernier projette réciproquement vers le mPFC mais aussi vers l'amygdale, formant un réseau bilatéral constitué des deux amygdales et des deux cortex préfrontaux (Little et Carter, 2012).

Au niveau des différentes structures du mPFC, des expériences d'anatomie ont montré chez le rat adulte qu'à la suite des processus de perte neuronale qui apparaissent pendant l'adolescence, la proportion de neurones entre le PL et l'IL qui projettent vers le BLA est la même. Plus spécifiquement, il a été montré que les projections des neurones de l'IL ciblent majoritairement les neurones inhibiteurs du BLA et développent une densité d'épines dendritiques plus importante par rapport aux projections entre le PL et le BLA. Toutefois, les projections du PL et de l'IL au sein du BLA ne sont pas pleinement fonctionnelles avant la fin de l'adolescence, puisque cette période est encore marquée par l'immaturité des interneurons inhibiteurs du BLA. Il a également été démontré que l'élagage des fibres du PL et de l'IL vers le BLA est asynchrone, puisque les fibres en provenance de l'IL subissent des élagages pendant la période d'adolescence, entre PN25 et PN45, tandis que celles du PL ont un élagage plus lent et plus tardif, correspondant à l'adolescence tardive et l'âge adulte, entre PN45 et PN90 (Cressman et al., 2010a-b). Les fibres entre le BLA et l'IL mûrent donc plus précocement que les fibres BLA-PL, et les mécanismes d'élagages des fibres du BLA en provenance de l'IL apparaissant au cours de l'adolescence, ces phénomènes pourraient créer des déséquilibres d'activité du réseau et provoquer les manifestations comportementales décrites dans la partie 1 (**Figure 1.10**).

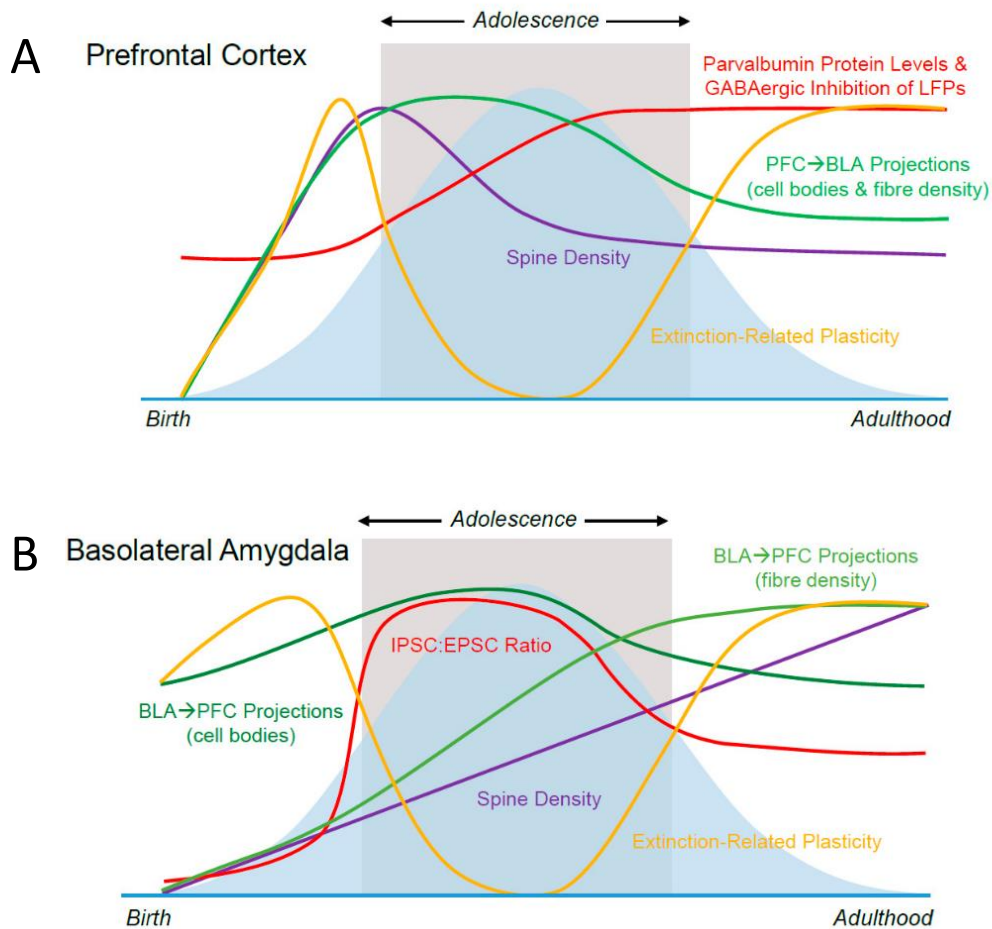


Figure 1.10 : Schémas représentatifs des modifications neuroanatomiques du cortex préfrontal et de l'amygdale au cours du développement cérébral chez le rongeur. Selon Zimmermann et al., 2019.

La zone grisée représente la période d'adolescence. La courbe en cloche bleutée représente les niveaux de retours de peur observés après extinction de peur, plus importants au cours de l'adolescence. La courbe jaune met en évidence la plasticité synaptique associée à l'apprentissage de l'extinction, quasiment absente pendant la période d'adolescence. Les courbes rouges représentent la fonctionnalité de la transmission inhibitrice, et sera abordée au point B.2 de cette partie.

La **Figure 1.10** est un résumé des premiers points abordés au cours de cette partie : Notons ainsi les phénomènes développementaux apparaissant dans le mPFC et le BLA de manière séquentielle et structure-spécifique. Le cortex préfrontal subit des modifications massives de son anatomie au cours de l'adolescence (**A**) : En raison des phénomènes d'élagages et d'apoptose, la densité des épines dendritiques diminue de moitié à partir de la puberté, suivi d'une diminution de la densité des corps cellulaires des neurones qui projettent vers le BLA, ainsi que de leurs fibres (courbes violette et verte). Cette période est aussi marquée par les réorganisations cytoarchitecturales des couches cellulaires et du développement des projections BLA-mPFC (non montré). Le noyau basolatéral de l'amygdale possède des modifications neuroanatomiques différentielles (**B**), puisqu'à l'instar du cortex préfrontal, la densité des projections en provenance des corps cellulaires augmente au début de l'adolescence avant de diminuer (courbe vert foncé), ce qui est suivi d'une augmentation du développement des fibres et de la densité des épines dendritiques dans le mPFC tout au long du développement (courbes en vert clair et violet). En raison de l'immaturation du cortex préfrontal et des profonds changements morphologiques et structuraux entre le BLA et le mPFC à cette période, ces études sur le développement des projections anatomiques réciproques entre le BLA et le mPFC nous permettent de mieux comprendre comment les déficits d'extinction de la peur et de son maintien en mémoire se mettent en place pendant l'adolescence chez le rongeur. En effet, les restructurations massives altèrent la mise en place de la plasticité synaptique dans les réseaux impliqués dans l'apprentissage de l'extinction de la peur (courbe jaune), ce qui aboutit à des déficits comportementaux propres à la période d'adolescence.

Ainsi, les processus développementaux apparaissant de manière bidirectionnelle entre le BLA et le mPFC sont résumés dans la **Figure 1.11** :

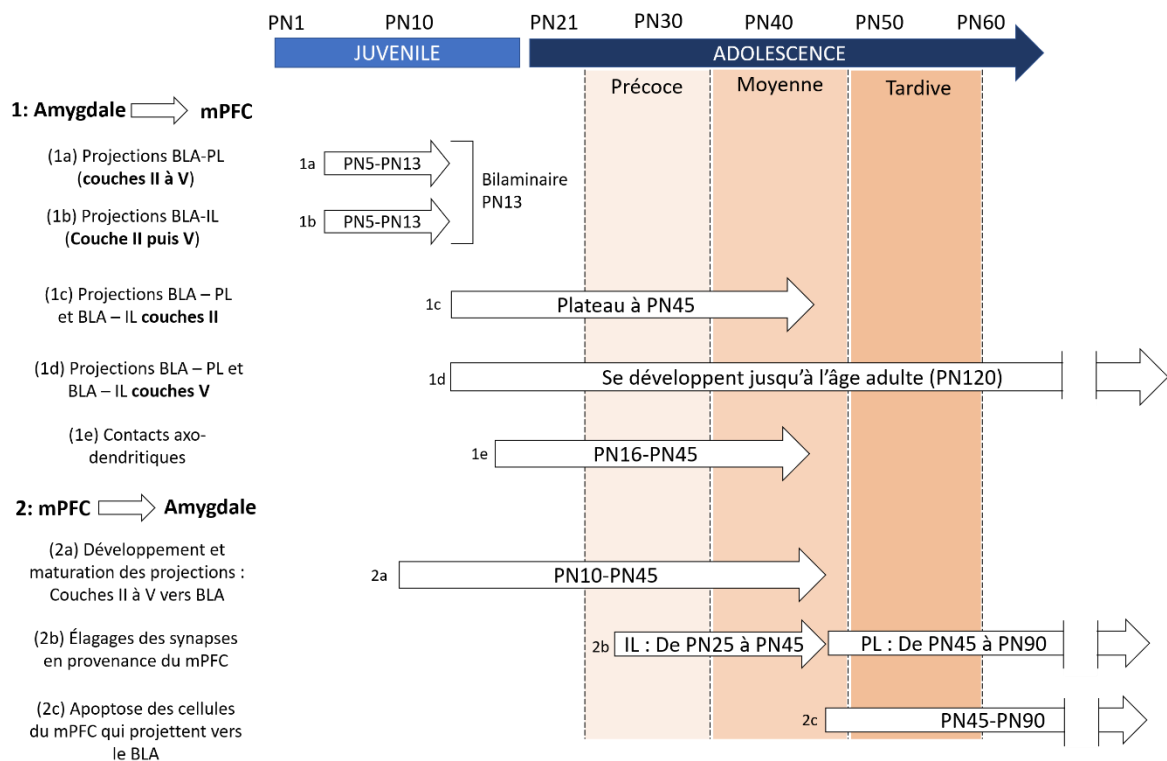


Figure 1.11 : Schéma récapitulatif des processus développementaux bidirectionnels qui apparaissent dans le circuit amygdale – cortex préfrontal entre l’âge juvénile et l’âge adulte chez le rat.

En haut sont représentées les périodes correspondant à l’âge juvénile (PN1-PN20, bleu ciel) et adolescent (PN21-PN60, bleu foncé). Les cadres de couleur rose représentent les périodes d’adolescence précoce, moyenne et tardive. La colonne de gauche représente en (1) les processus développementaux apparaissant du BLA vers le mPFC et en (2) du mPFC vers le BLA. Les flèches qui font face aux processus développementaux représentent les plages d’âge auxquels ces processus développementaux mentionnés (1a-1e; 2a-2c) apparaissent. Nous pouvons ainsi observer que les projections du BLA vers le PL et du BLA vers l’IL se développent à partir de PN5, spécifiquement dans les couches II à V du PL (1a) et II de l’IL (1b) avant de former un pattern de bilamination dans les deux structures autour de PN13. Par la suite, ces projections poursuivent leur développement et leur maturation avant d’atteindre un plateau à PN45 pour les projections vers les couches II (1c) et à PN120 vers les couches V (1d) du mPFC. Enfin, la formation des contacts axo-dendritiques se forment entre PN16 et PN45 (1e). En parallèle, les projections du mPFC vers le BLA se développent entre PN10 et PN45 (2a) avant d’être élaguées jusqu’à la mi-adolescence pour les fibres en provenance de l’IL (PN25-PN45) et jusqu’à l’âge adulte pour celles en provenance du PL (PN45-PN90 ; 2b). A la suite de ces mécanismes d’élagage, les cellules du mPFC qui projettent vers le BLA subissent une apoptose entre la fin de l’adolescence moyenne et l’âge adulte (2c).

3. Développement des projections du vHPC vers le mPFC

L'hippocampe possède une architecture cellulaire bien organisée très précocement dans le développement, autour de 34 semaines *in utero* chez l'Homme (Arnold et Trojanowski, 1996). En revanche, le développement de ses réseaux se poursuit jusqu'à l'adolescence, et ces caractéristiques sont retrouvées chez l'Homme, le rongeur, et le primate (Benes, 1994; Kornack et Rakic, 1999). Chez le rongeur, le volume hippocampique augmente pendant l'adolescence (Goddings et al., 2014) et atteint sa maturité structurelle et fonctionnelle autour de PN35 (Baudry, 1981; Crain et al., 1973; Jacobson, 1963). En parallèle, la connectivité fonctionnelle avec le BLA et le mPFC se développe pendant l'adolescence où la densité de ses projections vers le mPFC augmente drastiquement entre PN23 et PN30 (Pattwell et al., 2016a), avant de subir des élagages au début de la vie d'adulte. Sa connectivité fonctionnelle avec le mPFC n'est pas pleinement mature avant la fin de l'adolescence, puisque des stimulations des fibres du vHPC projetant vers le mPFC induisent des dépressions à long terme de type adulte seulement à partir de PN55, mais pas pendant l'adolescence plus précoce (Caballero et al., 2014a). Dans le cas de l'hippocampe, sa maturité anatomique précède donc largement sa fonction sur la régulation de l'activité du mPFC et du BLA (Goddings et al., 2014; Marek et al., 2018; Pattwell et al., 2016b) et que le contrôle inhibiteur de l'hippocampe sur le mPFC n'est pas suffisamment mature pendant la période d'adolescence pour exercer un contrôle régulateur sur l'activité de ce réseau.

Des études s'intéressant à la fonctionnalité des projections entre le vHPC et le mPFC au cours du développement chez la souris ont montré que les projections du vHPC ciblent à la fois les neurones pyramidaux et les interneurons inhibiteurs du cortex préfrontal localisés dans les couches V et II du cortex infralimbique, et de la couche V du cortex prélimbique (Liu et Carter, 2018; Marek et al., 2018). Ces études nous permettent ainsi de comprendre comment l'hippocampe ventral régule l'activité du PL et de l'IL lors des tâches d'apprentissage et d'extinction de la peur : comme nous l'avons discuté dans la partie 1 de cette introduction, en ciblant les mêmes couches corticales que les cellules impliquées dans la régulation des comportements de peur, son activité est à la fois pro-excitatrice et pro-inhibitrice, et permet d'assurer l'expression de la peur au travers de l'activation du PL et de l'inactivation de l'IL, mais

aussi d'assurer son extinction en favorisant plutôt l'activation du cortex infralimbique (Marek et al., 2018).

Au travers de ces études, nous pouvons donc conclure que les connectivités entre le BLA, le mPFC et l'hippocampe se développent de manière séquencée et asynchrone entre la vie juvénile et l'âge adulte. Ces développements de connectivité entre les structures sont concomitants avec le développement de chacune de ces structures, ce qui aboutit à des modifications structurelles et fonctionnelles importantes, particulièrement au moment de l'adolescence. Les déficits comportementaux observés et détaillés en Partie 1 de cette introduction sont ainsi directement liés à ces processus de maturation apparaissant à cet âge clé. L'immaturation des connectivités n'est cependant pas la seule responsable des déficits comportementaux, puisque les transmissions glutamatergiques et GABAergiques poursuivent également des processus de maturation entre la vie juvénile et l'âge adulte.

B. Développement de la transmission glutamatergique et GABAergique entre l'amygdale, l'hippocampe et le cortex préfrontal

1. Développement de la transmission AMPA/NMDA et manifestations comportementales

Au cours du développement cérébral précoce, la maturation structurelle des terminaisons axoniques est marquée par l'apparition des flux calciques au travers des canaux calciques voltage-dépendants présents au niveau des membranes, permettant de libérer les neurotransmetteurs stockés dans des vésicules présynaptiques. Ces canaux calciques mûrissent progressivement au travers de modifications de la composition des sous unités des récepteurs, modifiant ainsi la probabilité de libération des neurotransmetteurs et la sensibilité au calcium (Ziv et Garner, 2004). Au niveau postsynaptique, les récepteurs glutamatergiques se mettent en place sur les épines dendritiques, tandis que les récepteurs GABAergiques sont localisés sur les dendrites (Khazipov et al., 2001; Tyzio et al., 1999). Les récepteurs glutamatergiques sont regroupés en deux classes : on distingue les récepteurs ionotropiques, activés selon les flux ioniques (AMPA, NMDA, Kainate), et les récepteurs métabotropiques (mGluR) qui déclenchent des cascades de signalisation intracellulaires lorsqu'ils sont activés. Précocement dans le développement pré et post-natal, ils sont présents en très grande quantité dans le cerveau, atteignant un pic de densité à la fin de la première semaine de vie du rongeur pour les récepteurs NMDA, et entre 10 et 12 jours pour les récepteurs AMPA (Jantzie et al., 2015; Jensen, 2002). Les récepteurs glutamatergiques subissent des modifications de leur structure au cours du développement, puisqu'ils expriment des sous unités leur conférant une sensibilité différentielle aux neurotransmetteurs et leur conférant des propriétés électrophysiologiques distinctes. Par exemple, précocement dans le développement, la majorité des récepteurs NMDA sont constitués de sous-unités spécifiques telles que le GluN2B (ou autrement appelés NR2B), dont l'activité induit une sensibilité élevée aux neurotransmetteurs et une haute excitabilité des neurones, associées à une constante de déclin du courant lente dans le temps. Ces propriétés confèrent au cerveau juvénile des capacités hautement plastiques, mais sont cependant responsables de l'apparition d'épilepsies, d'une sensibilité élevée à l'hypoxie, ou

encore de l'apparition des troubles autistiques (Gatto et Broadie, 2010), puisqu'une haute concentration en glutamate est neurotoxique.

Les récepteurs AMPA et NMDA du BLA sont tous les deux impliqués dans l'acquisition, l'expression et l'extinction de la peur conditionnée à la fois chez le rat juvénile et adulte. Des études d'inhibition chez le rat adulte ont montré que les récepteurs AMPA et NMDA contribuaient différemment à l'expression et à l'extinction de la peur conditionnée, puisqu'une inhibition des récepteurs AMPA du BLA par l'antagoniste NBQX injecté chez le rat à l'âge adulte altère l'expression de la peur au premier SC auditif de la séance d'extinction, sans altérer sa mémoire à long terme 24h plus tard, suggérant des rôles dans le maintien en mémoire de l'apprentissage de peur. L'inhibition des récepteurs NMDA du BLA uniquement n'altère pas l'expression de la peur au cours de la séance d'extinction, mais empêche cependant la mise en place de sa mémoire à long terme (Zimmerman et Maren, 2010). De manière intéressante, il a été montré par la même équipe que l'inhibition des récepteurs NMDA par une injection de l'antagoniste APV dans le BLA altère l'expression de la peur dans un protocole de conditionnement au contexte. Ces éléments pourraient ainsi suggérer que les récepteurs sont impliqués différemment dans l'expression de la peur conditionnée à un SC auditif et au contexte (Maren et al., 1996). D'autres expériences chez le rat juvénile et adulte ont montré des résultats similaires à ceux observés chez les animaux adultes, cette fois-ci en modifiant la transmission glutamatergique dans le mPFC. En effet, l'application d'un antagoniste NMDA avant une séance d'extinction de peur conditionnée au son altère la rétention en mémoire de cette extinction chez le juvénile et chez l'adulte (Langton et al., 2007; Langton et Richardson, 2010), sans toutefois tester la fonctionnalité de cette transmission NMDA au cours de l'adolescence.

Au cours de l'adolescence, la modification des sous-unités de récepteurs participe aussi aux processus de remodelage et de maturation des neurones du cortex. Il a par exemple été montré que les synapses apicales des neurones des couches V du mPFC expriment des sous-unités des récepteurs NMDA type adultes à partir de PN40, correspondant au moment où ces mêmes synapses terminent leur développement, leur maturation et subissent des élagages (Flores-Barrera et al., 2014, voir **Figure 1.11**). Ces étapes de maturation peuvent être reflétées au travers de la mesure de l'expression des protéines Arc (impliquée dans la synaptogénèse)

et c-FOS, dont les niveaux d'expression basaux chez le rat sont plus élevés dans le cerveau antérieur (mPFC, cortex orbitofrontal) des animaux adolescents (PN30) par rapport aux animaux adultes (PN70) (Schochet et al., 2005) et que ces expressions différentielles sont directement liées aux processus de synaptogenèse et spinogenèse qui apparaissent encore au cours de l'adolescence, et pour lesquels l'activité de la protéine Arc est nécessaire. D'autre part, l'augmentation basale de c-FOS, également mesurée dans le mPFC chez souris entre PN30 et PN70 (Leslie et al., 2004) pourrait être liée aux processus de plasticité synaptique qui apparaissent de manière concomitante dans ces zones corticales pendant le développement. Ainsi, les déficits d'extinction observés chez l'adolescent pourraient être expliqués par l'immaturation de la transmission glutamatergique entre les structures : les hypothèses actuelles portent sur la fonctionnalité des récepteurs NMDA qui ne sont pas pleinement fonctionnels avant PN40, induisant des déséquilibres dans la transmission glutamatergique au sein du mPFC, et perturbant les processus de plasticité synaptique. Pour autant, même si cette hypothèse expliquerait les déficits observés pendant l'adolescence précoce, elle n'explique cependant pas les déficits d'extinction observés entre PN40 et PN60 chez le rat.

Des études de Pattwell et collaborateurs en 2012 ont montré dans un test de la mémoire de l'extinction de peur chez la souris juvénile (PN23) et adulte (PN70) que les neurones du cortex infralimbique présentent une augmentation de l'amplitude des EPSC associée à une augmentation de l'expression des récepteurs glutamatergiques AMPA et du marqueur d'activité cellulaire c-FOS dans la couche V du cortex infralimbique (Pattwell et al., 2012). Les animaux adolescents (PN29), quant à eux, présentaient des déficits d'apprentissage de l'extinction de la peur, sans modification des EPSC ni de l'expression des récepteurs AMPA et du marqueur d'activité cellulaire c-FOS. Ces résultats suggèrent donc deux choses : (1) Que les récepteurs AMPA sont préférentiellement recrutés pour mettre en place la mémoire de l'extinction dans le cortex infralimbique, et (2) que ces récepteurs ne sont pas correctement recrutés ou exprimés chez l'adolescent, entraînant ainsi des déséquilibres d'activité de l'IL résultant en des déficits d'extinction de la peur. Concernant la fonctionnalité des récepteurs NMDA, il a été démontré chez le rat adolescent qu'il nécessitait le double des présentations du SC auditif au cours de la tâche d'extinction pour activer la transmission NMDA dans le cortex infralimbique (reflétée par l'expression d'une protéine de voie de signalisation NMDA-

dépendante, la Mitogen Activated Protein Kinase phosphorylée (pMAPK) (Kim et al., 2011), et induire une rétention de l'extinction de type adulte.

A l'heure actuelle, nous savons que les sous-unités NMDA ont une variabilité régionale, temporelle et spécifique à certains tissus et zones cérébrales, mais les modifications exactes de ces sous-unités en fonction de l'âge ou de la structure (BL, LA ou PL, IL) restent à approfondir. L'hypothèse actuelle selon Flores-Barrera en 2014 est que la restructuration des sous-unités des récepteurs prend place au moment où l'arborisation dendritique a terminé sa maturation, puisque la mise en place des récepteurs NR2B observés dans les dendrites apicales des cellules pyramidales du mPFC à PN40 coïncident avec l'âge auquel ces dendrites terminent leur maturation.

En conclusion, ces résultats suggèrent qu'au cours de l'adolescence, les déficits d'extinction et de son rappel peuvent être dus à l'immatunité de la transmission glutamatergique du mPFC et du BLA, puisque les récepteurs restructurent progressivement leurs sous-unités, et donc leur fonctionnalité. De plus, les récepteurs AMPA et NMDA sont différenciellement recrutés dans ces deux structures selon les tâches comportementales (**Tableau 1.2**).

	Extinction de peur conditionnée (Pavlovien simple)
AMPA (BLA)	Mémoire de l'apprentissage (rat, adulte); (Zimmerman et Maren, 2010)
NMDA (BLA)	Mémoire à long terme de l'extinction (rat, adulte); (Zimmerman et Maren, 2010)
NMDA (mPFC)	Rétention en mémoire de l'extinction (Rat, juvénile et adulte); (Langton et Richardson, 2010; Langton et al., 2007)
NMDA (IL)	Double des présentations pour induire la transmission NMDA (rat, adolescent); (Kim et al., 2011)
AMPA (Couche V IL)	Mémoire de l'extinction déficiente (souris, juvénile); (Pattwell et al., 2012)

Tableau 1.2 : Tableau (non exhaustif) récapitulatif des rôles de la transmission AMPA et NMDA dans l'extinction de peur conditionnée. La colonne de gauche représente la fonctionnalité de la transmission AMPA ou NMDA selon les structures étudiées (BLA, gris clair ; mPFC, gris foncé). La colonne du milieu et de droite concernent respectivement les études de ces fonctionnalités au cours de l'extinction de peur ou de l'apprentissage.

Nous pouvons ainsi observer dans le **Tableau 1.2** que les récepteurs NMDA sont plutôt impliqués dans la mise en place de la mémoire à long terme de l'extinction, à la fois dans le BLA et dans le mPFC, tandis que les récepteurs AMPA semblent intervenir dans la mise en place de la mémoire liée à l'apprentissage conditionné dans le BLA et de l'extinction dans l'IL. Ces caractéristiques fonctionnelles semblent déficitaires au cours de l'adolescence et à la fin de l'âge juvénile.

2. Développement du système GABAergique dans l'amygdale et le cortex préfrontal

Parmi les modifications structurelles et fonctionnelles apparaissant dans le circuit APH au cours de l'adolescence, la transmission GABAergique subit également des modifications de sa fonctionnalité en fonction du stade du développement cérébral. En effet, au cours du développement la maturation fonctionnelle de la transmission inhibitrice est marquée par des modifications de la libération de neurotransmetteurs ou encore de l'expression de protéines spécifiques du système GABAergique, et est une étape importante pour réguler l'équilibre et l'activité des réseaux. Malgré le fait que nous ne nous soyons pas penchés spécifiquement sur les caractéristiques GABAergiques du réseau amygdale-préfrontal-hippocampe au cours de cette thèse, il est néanmoins important de souligner l'importance du système GABAergique dans le développement du réseau afin de mieux comprendre l'apparition des comportements typiques associés à l'adolescence, mais aussi de l'émergence des dysfonctions qui sous-tendent les pathologies émotionnelles.

Les interneurones inhibiteurs sont des neurones de petite taille, agissant sur l'excitabilité des neurones excitateurs sur de courtes distances et permettant de réguler l'excitabilité locale des neurones présents au sein d'une structure. Ils synthétisent le GABA (Acide Gamma Amino Butyrique), un neurotransmetteur qui se lie spécifiquement sur des récepteurs post-synaptiques GABAergiques, dont les propriétés structurelles modulent les réponses post-synaptiques (cinétique d'activation, flux ioniques, excitabilité). Les récepteurs GABAergiques sont constitués de 5 sous-unités protéiques dont l'expression change selon les structures ou le stade de développement. On distingue les récepteurs GABA_A, ionotropiques (activés par des flux ioniques) et GABA_B, métabotropiques dont l'activation déclenche l'activité de cascades de signalisation.

Les interneurones inhibiteurs sont regroupés en plusieurs catégories, définies par le type de protéines qu'ils expriment et qui régulent l'excitabilité des interneurones, leur conférant des propriétés électrophysiologiques distinctes (potentiel de membrane au repos, taux de décharge, vitesse de la transmission, réponses post-synaptiques). Dans le cortex, les interneurones constituent seulement 10 à 20% de la population neuronale mais présentent une variabilité importante, puisqu'il a été estimé qu'une vingtaine de sous-types

d'interneurones inhibiteurs différents sont localisés dans le cortex (Kawaguchi et Kubota, 1997). On trouve alors les neurones à parvalbumine (PV), calrétinine (CR), calbindine (CB) ou encore à somatostatine (SST) qui sont des protéines exprimées par ces interneurones et qui ont pour propriétés de fixer le calcium intracellulaire afin de réguler l'excitabilité des interneurones (Ascoli et al. 2008). Parmi ces sous-types, les neurones PV et SST sont les interneurones majoritaires du cortex puisqu'ils constituent respectivement 40% et 30% des interneurones GABAergiques du cortex du rat et de la souris (Kawaguchi et Kubota, 1997; Rudy et al., 2011).

Des études d'immunohistochimie ont étudié la distribution et le nombre de neurones à parvalbumine présents dans l'amygdale du rat entre E20 et PN90 (Berdel et Morys, 2000). Les premiers neurones à PV apparaissent dans l'amygdale entre 14 et 17 jours après la naissance puis mûrent jusqu'à atteindre une morphologie de type adulte à PN30. Leur nombre augmente drastiquement jusqu'à PN21 dans la partie la plus postérieure du noyau basal, avant de se stabiliser autour de PN30 et de coloniser les parties les plus antérieures du noyau BL et dans le LA jusqu'à PN90. Au sein même des noyaux de l'amygdale il existe donc un développement asynchrone des interneurones inhibiteurs, en particulier les neurones PV, avec une apparition tardive de ces neurones dans certains noyaux de l'amygdale. Notons cependant que les auteurs ont également étudié le développement des interneurones à calbindine, qui sont représentés de manière homogène dans les différents noyaux de l'amygdale dès la vie embryonnaire, atteignant une maturité de type adulte dès PN21. Il existe donc une transmission inhibitrice qui se met en place progressivement dans l'amygdale entre la phase prénatale et l'âge adulte.

En termes de fonctionnalité de la transmission GABAergique au sein de l'amygdale, des études de Ehrlich et collaborateurs en 2013 ont montré par électrophysiologie sur tranche d'amygdale de rats âgés de PN7 à PN35 que la transmission GABAergique n'était pas pleinement fonctionnelle avant PN28, où les courants post-synaptiques, les constantes de déclin suite à une stimulation et le potentiel de repos membranaire sont de type adulte au cours de cette période (Ehrlich et al., 2013). D'autres études ont mesuré la fonctionnalité de la transmission inhibitrice des différents noyaux du BLA chez la souris et ont montré que, suite à une stimulation, la fréquence des courants post synaptiques inhibiteurs (IPSC) et le ratio inhibition/excitation (IPSC:EPSC) augmentent entre PN10 et PN30, avant de diminuer à l'âge

adulte. Dans le LA, la transmission évolue différemment puisque la fréquence des IPSC et le ratio IPSC:EPSC augmentent de l'âge juvénile jusqu'à l'âge adulte (Arruda-Carvalho et al., 2017; Bosch et Ehrlich, 2015). Ces phénomènes sont représentés par la courbe rouge dans la **Figure 1.10B**. Ces caractéristiques électrophysiologiques spécifiques des noyaux de l'amygdale concordent donc avec l'émergence des interneurons dans ces mêmes noyaux.

Dans le cortex préfrontal, l'émergence des interneurons inhibiteurs et leur développement dans la structure ne suit pas le même modèle qu'au sein de l'amygdale. Les premières études du développement des cellules GABAergiques du cortex préfrontal chez le rat ont été réalisées en 1976 par Coyle et Enna, qui ont montré la présence des premières cellules GABAergiques au cours de la vie prénatale, autour de E15. Ils ont également montré que la concentration en neurotransmetteur GABA à la naissance atteint 50% de celle trouvée chez les adultes, et que l'activité de l'enzyme productrice du GABA, la *Glutamic Acid Decarboxylase* (GAD) augmente jusqu'à l'âge adulte (Coyle and Enna, 1976). En termes de morphologie, les cellules GABA augmentent en taille entre PN1 et PN15 avant de diminuer à PN41, à la moitié de l'adolescence (Vincent et al., 1995). Au cours de cette période, l'expression de la parvalbumine augmente entre PN25-35, avant de se stabiliser entre PN45 et PN75, tandis que le nombre total de neurones exprimant la parvalbumine augmente légèrement entre l'âge juvénile et l'âge adulte (**Figure 1.10A**). Ces données suggèrent que les interneurons du cortex préfrontal sont morphologiquement matures à l'adolescence, mais continuent cependant leur maturation fonctionnelle entre la fin de la vie juvénile et l'âge adulte (Caballero et al., 2014a ; Caballero et al., 2014b).

Au sein de l'amygdale et du cortex préfrontal il existe donc des asynchronies de développement de la transmission GABAergique : à la fois sur la catégorie d'interneurons (calbindine, parvalbumine), leur localisation (noyau BL ou LA), mais aussi dans leurs propriétés intrinsèques (potentiel de membrane, constantes de déclin), ou dans la réponse des neurones post-synaptiques (sous-unités de récepteurs). Les interneurons inhibiteurs sont structurellement matures plus tardivement que les cellules excitatrices, résultant en des différences d'équilibre excitation/inhibition qui se reflètent particulièrement au cours de l'adolescence, pouvant impacter la fonctionnalité des structures associées.

3. Fonctionnalité de la transmission GABAergique dans le circuit APH

En raison de ses projections directes vers les cellules pyramidales et les interneurons du PL et de l'IL, il est désormais connu qu'une activation des afférences BLA-mPFC et vHPC-mPFC peuvent induire dans le mPFC des potentialisations et des dépressions à long terme (DLT) (Izaki et al., 2003; Laroche et al., 1990). Ces propriétés électrophysiologiques dépendent de l'âge, en raison des changements structurels apparaissant au sein de ces trois structures entre l'adolescence et l'âge adulte. En effet, Caballero et collaborateurs en 2014 ont mesuré les potentiels de champs apparaissant dans le mPFC en réponse à une stimulation à haute fréquence (SHF) dans le vHPC ou le BLA chez des rats adolescents (PN 30-40 et PN 45-55) et des rats adultes (PN 65-85 et PN 95-120)(Caballero et al., 2014a). Les résultats ont montré que la SHF du vHPC n'induit aucune modification des potentiels de champs du mPFC des rats âgés de PN30-40, et un effet transitoire pour le groupe PN45-55. En revanche, la SHF induit une dépression à long terme dans le mPFC des rats âgés de PN65-85 et PN95-120 sans différences entre les deux groupes, suggérant ainsi que la fonctionnalité des voies vHPC-mPFC atteint un niveau de maturité de type adulte après PN55. En parallèle, la SHF du BLA induit une potentialisation à long terme dans le mPFC aussi bien pour le groupe PN30-40 que pour le groupe PN65-85, avec cependant une amplitude de réponse plus faible pour le groupe adolescent. Enfin, les auteurs ont réalisé ces mêmes expériences en appliquant de la picrotoxine (inhibiteur des récepteurs GABA_A) dans le mPFC dans le but d'évaluer la contribution de la transmission GABAergique du mPFC en réponse à l'activité du vHPC et du BLA. Ces expériences ont montré que l'inhibition de la transmission GABAergique dans le mPFC suite à une SHF dans le vHPC n'a pas modifié les potentiels de champs pour le groupe PN30-40, tandis que cette inhibition à PN65-85 abolit la mise en place de la DLT en faveur d'une potentialisation à long terme. En parallèle, l'application de picrotoxine avant SHF du BLA n'a pas provoqué de modifications du potentiel de champ du mPFC quel que soit l'âge des animaux. Ces résultats suggèrent alors que l'expression de la LTD dans le cortex préfrontal après stimulation à haute fréquence du vHPC est GABAergique et âge-dépendante, tandis que la transmission BLA-mPFC après stimulation à haute fréquence ne requiert pas la fonctionnalité du système GABAergique dans le mPFC, quel que soit l'âge des animaux. Les auteurs ont également montré que la réponse de PLT suite à l'inhibition des GABA_A dans le mPFC est aussi

âge-dépendante, puisqu'elle n'est pas fonctionnelle avant PN45. Le cortex préfrontal étant encore en pleine maturation à cette période, les propriétés électrophysiologiques qui en découlent sont donc encore immatures.

L'équipe de Thomases en 2013 a étudié les impacts d'une altération de l'activité glutamatergique dans le mPFC du rat adolescent sur la transmission inhibitrice entre le vHPC et le mPFC à l'âge adulte (Thomases et al., 2013). Pour cela, ils ont administré de manière répétée un antagoniste des récepteurs glutamatergiques NMDA (MK-801), entre PN35 et PN40. Les auteurs ont mesuré les potentiels de champ locaux du mPFC qui résultaient d'une stimulation à haute fréquence du vHPC et ont montré que suite à l'application de MK-801 à l'adolescence, les potentiels de champs locaux du mPFC mesurés entre PN65 et PN85 étaient désinhibés, de la même manière que ceux observés par des études précédentes sur des rats contrôles à PN30-40, cette désinhibition était absente lorsque les animaux recevaient du MK-801 à l'âge adulte. De plus, une administration aigue d'un agoniste GABA_A (Indiplon, un modulateur allostérique positif) a rétabli le phénotype des animaux ayant reçu du MK-801 à l'adolescence. Ces résultats suggèrent qu'une perturbation de l'activité des cellules glutamatergiques du cortex préfrontal au cours de l'adolescence altère également la fonctionnalité des interneurons GABAergiques, et ce, de manière durable. Au cours de l'adolescence, la bonne fonctionnalité des cellules pyramidales est donc requise pour permettre le développement parallèle des circuits inhibiteurs. La « co-maturation » de ces circuits est donc indispensable pour établir un équilibre excitation/inhibition au sein des structures et entre les structures.

La mise en place de la mémoire de l'apprentissage et de l'extinction conditionnée nécessite donc le fonctionnement intégré des récepteurs glutamatergiques et GABAergiques ionotropiques et métabotropiques qui co-maturent progressivement de l'âge juvénile à l'âge adulte. Alors que les récepteurs ionotropiques subissent des modifications structurelles qui influencent les propriétés excitatrices des neurones, les récepteurs métabotropiques subissent également des remodelages. Lorsqu'ils sont activés, ils permettent d'induire le déclenchement de cascades de signalisation de protéines kinases qui favorisent l'activation de gènes précoces immédiats. L'activité de ces derniers est nécessaire à la synthèse protéique *de novo*, notamment celles impliquées dans la croissance axonique et dendritique, la mise en place des

épines dendritiques, ou encore la restructuration du cytosquelette. L'adolescence étant encore marquée par l'immaturation des structures et par la maturation de la transmission excitatrice et inhibitrice, il est tout à fait concevable que les voies de signalisation associées à l'activité cellulaire soient altérées, résultant en une perturbation de la synthèse des protéines nécessaires à la mise en place de cette plasticité et de la consolidation de la mémoire. Ainsi, de par les études de développement des projections et de la transmission excitatrice et inhibitrice, nous comprenons mieux comment les déficits comportementaux observés au cours de l'adolescence apparaissent.

Dans cette seconde partie, nous avons décrit les nombreuses modifications anatomiques et fonctionnelles apparaissant dans le circuit amygdalo-préfronto-hippocampique au cours du développement cérébral, et particulièrement au moment de l'adolescence. Cette période est en effet encore marquée par le développement des projections entre ces structures, de manière structure-dépendante et zone-dépendante (BL ou LA, PL ou IL). La maturation différentielle de ces projections résulte en un développement structurel et fonctionnel progressif des transmissions excitatrices et inhibitrices, qui déséquilibrent l'activité du réseau et expliquent les phénomènes comportementaux décrits au cours de la partie 1 de cette introduction.

C'est en raison de cette dynamique particulière que l'adolescence est considérée comme une période de haute vulnérabilité aux perturbateurs environnementaux, tels que le stress ou les maltraitances. La perturbation de ces mécanismes pendant le développement peut ainsi favoriser les déséquilibres d'activité entre les structures laissant apparaître les pathologies affectant en particulier le domaine émotionnel.

Dans la troisième et dernière partie de cette introduction, nous nous pencherons sur les caractéristiques neurobiologiques et cellulaires des pathologies liées à une dysfonction du circuit APH dans les désordres émotionnels et cognitifs associés à des éléments innés (génétiques) et/ou acquis (environnementaux)

PARTIE 3 : CARACTERISTIQUES
NEUROBIOLOGIQUES DES TROUBLES
EMOTIONNELS

I. Troubles émotionnels liés à des mutations génétiques : cas de la voie de signalisation mTOR

Dans la mise en place des processus d'apprentissage, la plasticité synaptique est indispensable et requiert un ensemble de molécules, de voies de signalisation, de protéines du trafic cellulaire et de récepteurs pré- et post-synaptiques. La plasticité synaptique est donc mise en place par l'activation de nombreux évènements intracellulaires (flux ioniques, voies de signalisation), eux-mêmes modulés par l'activité des structures associées (excitation ou inhibition), les hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire (adrénaline, corticostérone, hormones sexuelles), les neuromodulateurs (dopamine, sérotonine), l'état métabolique et nutritionnel (insuline, glucose, facteurs de croissance), ou encore les facteurs extérieurs (nicotine, alcool). Ensemble, ils permettent de moduler l'activité des cellules via l'activation de voies de signalisation et de la transcription de gènes immédiats précoces (*immediate early genes*, IEG), dont les protéines traduites favorisent la transcription de protéines nécessaires à la régulation de la plasticité synaptique. Une mutation génétique sur l'un de ces régulateurs peut être responsable de l'apparition de malformations, de retards mentaux ou encore de troubles émotionnels ou autistiques. Dans cette partie nous ne nous concentrerons pas sur toutes les voies de signalisation qui modulent l'activité des cellules du circuit APH dans les cas pathologiques, mais sur les principaux modulateurs de cette activité au cours du développement ainsi que sur le comportement de peur et les troubles émotionnels, en particulier la voie mTOR.

A. Fonctionnalité de la voie de signalisation mTOR

La protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) est une sérine-thréonine kinase senseur de l'activité énergétique. Elle est appelée ainsi car sa mise en évidence fait suite à la découverte de la rapamycine, une molécule isolée à partir d'une bactérie (*Streptomyces hygroscopicus*), qui possède comme propriété d'inhiber la prolifération cellulaire au travers de l'inhibition de l'activité de mTOR. La protéine mTOR contrôle ainsi les ressources énergétiques intra et extracellulaires et répond aux stimuli relatifs au métabolisme et à la croissance, tels que l'insuline, l'ATP, certains acides aminés, les facteurs de croissance, le glucose ou l'activité calcique. Dans les neurones, il est connu que l'activité mTOR est favorisée suite à la fixation du facteur de croissance BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), des neurotransmetteurs GABA et glutamate (par les récepteurs ionotropiques et métabotropiques), ainsi que par des neuromodulateurs tels que les monoamines (dopamine, sérotonine) ou encore l'acétylcholine (Switon et al., 2017).

Lorsqu'elle est activée par des facteurs trophiques, la protéine mTOR forme deux complexes constitués de plusieurs protéines, les complexes mTORC1 et mTORC2. Chacun d'entre eux possède des rôles distincts, puisque mTORC1 régule la traduction et la transcription de protéines du métabolisme, de la prolifération, de la croissance cellulaire, de l'autophagie et de l'apoptose, tandis que mTORC2 régule la dynamique du cytosquelette qui apparait lors de la migration cellulaire (**Figure 1.12** ; Malik et al., 2013; Switon et al., 2017 ; Revues). De par ses rôles multiples dans la régulation de l'activité cellulaire, nous parlerons préférentiellement de l'activité de mTOR au travers de son complexe mTORC1. Lorsqu'il est activé, mTORC1 favorise la transcription de protéines au travers de l'activation de ses effecteurs comme la protéine p70S6K, ou autrement appelée S6K1 (Ribosomal protein S6-kinase 1). Le principal régulateur de l'activité de mTOR réside dans la formation du complexe TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*) formé des deux protéines TSC1 (Hamartine) et TSC2 (Tubérine) qui agissent comme des suppresseurs de croissance au travers de leur activité inhibitrice du complexe mTORC1.

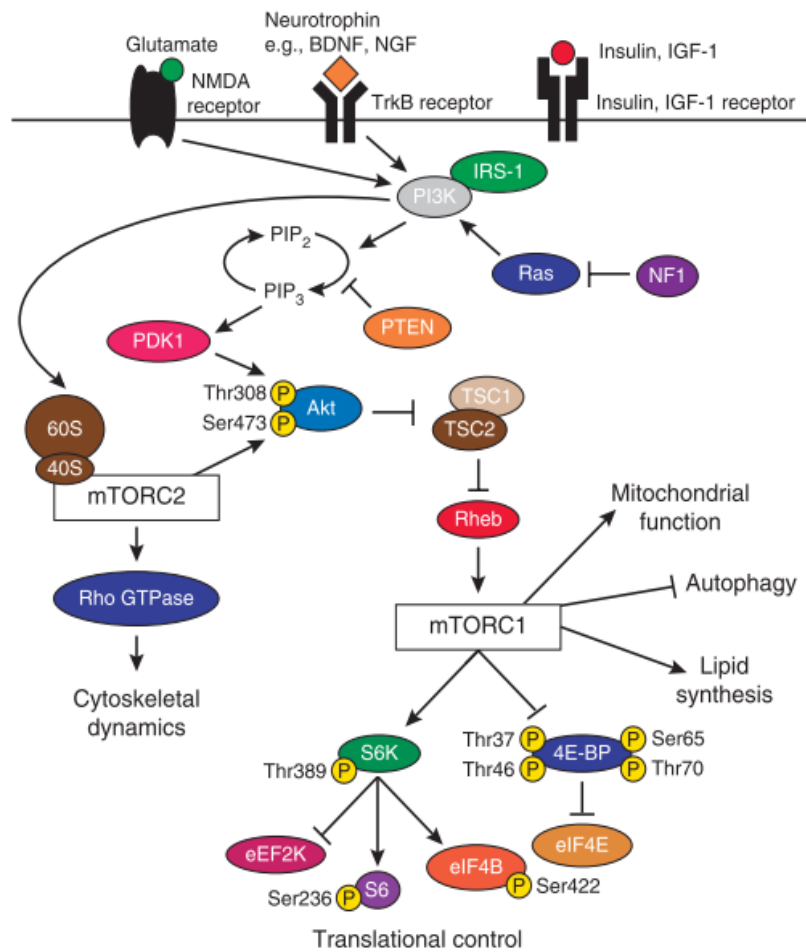


Figure 1.12 : Représentation schématique de la voie de signalisation mTOR. Selon Costa-Mattioli et Monteggia, 2013

En réponse à des facteurs trophiques (insuline, *Internal Growth Factor*, IGF, BDNF), à l'activité énergétique (Glucose, ATP, acides aminés, non montré) mais aussi à l'activité des récepteurs glutamatergiques, GABAergiques ou aux neuromodulateurs, la formation des complexes mTORC1 et mTORC2 se mettent en place grâce à l'activité de protéines appartenant à la voie de signalisation mTOR, dont PI3K ou PDK1. A noter que le principal régulateur de l'activité mTORC1 est le complexe TSC, *Tuberous Sclerosis Complex*, constitué des protéines TSC1 et TSC2. Lorsque ce dernier est inactivé, il permet de lever l'inhibition sur l'activité mTOR et donc de favoriser les synthèses protéiques *de novo* grâce à l'activation de protéines telles que S6K1 ou 4E-BP.

Au cours du développement cérébral, l'activité de la protéine mTOR est indispensable puisque, précocement dans le développement, elle intervient dans les voies de signalisation nécessaires à la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire qui apparaissent au cours de la vie embryonnaire. Son activité est également essentielle dans la dendritogenèse et la spinogenèse, mais aussi dans les processus d'axogénèse et de guidage axonique. Ses fonctions permettent également de favoriser la survie des neurones par la diminution de l'apoptose et de l'autophagie, et favorisent aussi la régénération cellulaire suite à des lésions ou traumatismes (Berry et al., 2016; Jaworski et Sheng 2006, revue). En raison de son activité modulée par les neurotransmetteurs et de ses rôles dans la croissance des épines dendritiques et des axones, l'activité de mTOR est ainsi impliquée dans les processus de plasticité synaptique, de la potentialisation et dépression à long terme, et dans la consolidation de la mémoire.

Au niveau du comportement de peur, il a déjà été montré à plusieurs reprises que l'activité mTOR était essentielle à la consolidation de la mémoire et à la régulation de l'état émotionnel, puisque des dérégulations de son activité sont responsables de l'apparition de troubles anxieux et dépressifs. L'une des premières études à se pencher sur les rôles de la voie de signalisation mTOR dans les processus d'apprentissage de peur conditionnée a été réalisée en 2006 par Parsons et collaborateurs (Parsons et al., 2006). Dans leur expérience, des rats adultes ont reçu une infusion de rapamycine bilatéralement dans le BLA immédiatement après l'apprentissage conditionné, qui consistait en la présentation de 4 appariements d'un bruit blanc (SC) avec un choc électrique (SI) dans un contexte A. Vingt-quatre heures plus tard, un groupe était placé dans le contexte A seul et un second groupe dans un nouveau contexte B dans lequel était continuellement présenté le bruit blanc. Ainsi, les chercheurs ont testé à la fois la mémoire de la peur au contexte (A) et la peur au SC (bruit blanc, contexte neutre). Pour chacun des deux tests, les animaux infusés avec la rapamycine présentaient des taux de *freezing* significativement plus faibles que les animaux contrôles. En parallèle, les chercheurs ont mesuré les taux de la protéine S6K1 phosphorylée (S6K1-p). Cette protéine est à l'état actif lorsqu'elle est phosphorylée et elle reflète directement l'activité de mTOR (**Figure 1.12**). Les chercheurs ont ainsi trouvé que, suite à l'apprentissage conditionné, le BLA des rats n'ayant pas reçu la rapamycine présentait une augmentation significative du taux de la protéine S6K1-p, avec un maximum d'expression 60 min après la séance. Les animaux ayant reçu l'infusion de

rapamycine, quant à eux, présentaient dans le BLA une diminution significative des taux de la protéine S6K1-p. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'activité de la voie mTOR est essentielle dans la consolidation de la mémoire de l'apprentissage de peur dans le BLA, à la fois pour l'apprentissage au contexte ou pour l'apprentissage du SC. D'autre part, la mise en place de cette mémoire nécessite l'expression *de novo* de protéines impliquées dans la plasticité synaptique au travers de l'activation de S6K1.

Une seconde étude de Blundell et collaborateurs en 2008 sur la souris adulte ont cette fois-ci testé l'acquisition et la consolidation de la mémoire de peur dans un conditionnement simple, mais en injectant de la rapamycine de manière systémique par injection intrapéritonéale (Blundell et al., 2008). Ces injections ont été réalisées soit 30 min avant l'apprentissage, soit immédiatement après pour un second groupe, et la mémoire de peur au contexte seul a été testée 24h plus tard dans le contexte initial d'apprentissage. Les souris injectées avec la rapamycine avant l'apprentissage ne présentaient pas de déficits dans l'acquisition et l'apprentissage conditionné. En revanche, lors du retour au contexte initial de l'apprentissage, les souris injectées avant ou après l'apprentissage conditionné présentaient des taux de freezing significativement plus faibles que les animaux contrôles. Les auteurs ont ensuite testé les rôles de mTOR après le test de la mémoire de peur. Pour cela, les animaux ont été entraînés au conditionnement, testés dans le contexte initial, puis immédiatement injectés par de la rapamycine. Tous les animaux ont montré un niveau de peur élevé et équivalent lors du retour au contexte initial. Cependant, le test de mémoire 24h après l'injection a révélé que les animaux ayant reçu le traitement présentaient des taux de freezing plus faibles que les animaux contrôles, suggérant ainsi des déficits dans la consolidation de la mémoire traumatique, et ces effets sont durables puisque les animaux présentaient toujours une diminution de l'intensité de peur 7 jours plus tard. Ainsi, l'activité mTOR est bien essentielle à la consolidation de la mémoire de la peur.

Alors que la voie mTOR est indispensable à la mise en place de la plasticité synaptique (PLT, DLT) et de la consolidation de la mémoire de peur, une dérégulation de son activité a été observée dans les troubles émotionnels. En effet, dans le cas de la dépression sévère, caractérisée par une diminution de l'activité cellulaire, de la plasticité synaptique et d'une hypotrophie dans structures limbiques (amygdale, hippocampe) et corticales, la voie mTOR

semble être négativement régulée et favorise l'apparition des symptômes cognitifs et émotionnels dont la diminution des capacités mnésiques, d'une anhédonie (perte d'intérêts et de plaisir) et d'une augmentation des émotions négatives (tristesse, mélancolie, peur) (Ignácio et al., 2016). D'autres études de stress juvénile chronique par séparation maternelle chez la souris ont également montré qu'à l'âge adulte, les souris présentaient des comportements anxieux au test de l'open field et au labyrinthe en croix surélevée, associés à des troubles mnésiques lors d'un test de retrait de plateforme après apprentissage à la piscine de Morris. Parmi elles, une étude a montré que les souris stressées juvéniles présentaient une diminution de l'expression de mTOR et de la protéine S6K1-p dans l'hippocampe (Wang et al., 2020). Enfin, une autre étude récente a montré chez des souris adultes KO pour la protéine S6K1 une augmentation de l'anxiété au labyrinthe en croix surélevée et des déficits lors d'un rappel de la mémoire de peur après apprentissage conditionné au contexte, associés à une diminution de la neurogénèse hippocampique et de l'arborisation dendritique (Koehl et al., 2020). Ainsi, au travers de ces modèles, une diminution de l'expression de mTOR ou de ses protéines cibles (S6K1) participent à la diminution de l'activité hippocampique et favorisent le développement des troubles liés à la peur ou à la dépression.

B. Implication de la voie mTOR dans les troubles neurodéveloppementaux

Il est désormais connu qu'une augmentation de l'activité de la voie mTOR est observée dans certaines maladies neurodéveloppementales et psychiatriques telles que les troubles autistiques. De ce fait, la majorité des études qui se sont portées sur les rôles de la voie mTOR ont été réalisées sur les modèles animaux de ces maladies, en particulier celles associées à son régulateur négatif principal : la protéine TSC2.

Les protéines TSC1 et TSC2 (ou Tsc1 et Tsc2 chez l'animal) tirent leur nom de la sclérose tubéreuse, une pathologie qui se manifeste suite à une mutation qui apparaît dans la structure de l'une de ces protéines et qui induit une perte de fonction résultant en une hyperactivation constitutive de la voie mTOR. Ceci induit chez les individus atteints l'apparition de tumeurs non cancéreuses (hamartomes), d'épilepsies, de retards mentaux pour la moitié, voire les deux tiers, des individus atteints, mais aussi de syndromes autistiques pour 40 à 50 % des patients, associés pour 90% des patients à des troubles émotionnels et cognitifs, tels que les troubles obsessionnels compulsifs, les déficits de l'attention et de l'hyperactivité, ainsi que les troubles anxieux et dépressifs (Curatolo et al., 2015; Tee et al., 2016, revues). Ainsi, les altérations neuropsychiatriques liées à une mutation de TSC sont tellement représentées dans la population atteinte qu'elles sont regroupées sous le nom de « désordres psychiatriques associées à la sclérose tubéreuse » (tuberous-sclerosis-associated neuropsychiatric disorders, TAND).

Les troubles du spectre autistique sont des maladies neurodéveloppementales caractérisées par des déficits dans les comportements sociaux, la communication et le langage, associés à des comportements stéréotypés et répétitifs. Dans la voie mTOR, les protéines qui régulent négativement la voie, comme PTEN, TSC, Akt et S6K, ont toutes été associées à l'apparition de troubles du spectre autistique, en lien avec une suractivité de la protéine mTOR. Des études de mutants hétérozygotes de perte de fonction de TSC2 chez la souris ont montré des déficits dans la mise en place de la mémoire à long terme à la piscine de Morris et une généralisation de la peur au contexte en conditionnement de peur au contexte (Ehninger et al., 2008). Au niveau cellulaire et fonctionnel, des déficits en TSC2 ont montré une diminution des capacités de mise en place de la dépression à long terme dans l'hippocampe, associés à une

hypertrophie neuronale et des désorganisations de la lamination corticale (Costa-Mattioli et Monteggia, 2013, Revue). D'autre part, il a été montré chez la souris mutante hétérozygote TSC2 l'apparition d'une augmentation de la densité des épines dendritiques avec une diminution de l'élagage synaptique, en particulier dans la couche V du mPFC, associés à une perte des fonctions d'autophagie (Tang et al., 2014). Ensemble, ces résultats suggèrent qu'une hyperactivité constitutive de mTOR chez l'animal et chez l'Homme sont responsables de l'altération de la morphologie neuronale, caractérisée par une perte de l'élagage synaptique, une hypertrophie neuronale, ainsi que des désorganisations structurelles et fonctionnelles dans le mPFC et l'hippocampe. L'apparition fréquente d'épilepsies chez les patients suggère aussi des désordres de l'équilibre exciteur/inhibiteur pouvant être à l'origine des troubles comportementaux, y compris en ce qui concerne le comportement de peur et la mémoire. Ainsi, de par ses rôles très vastes dans la fonctionnalité globale du cerveau, une dérégulation de l'activité de mTOR – qu'elle soit hyper- ou hypo- active – au cours du développement favorise l'émergence de troubles émotionnels et cognitifs liés à la peur, l'anxiété ou la dépression.

II. Neurobiologie du stress

Suite à un danger ou une menace, l'axe hypothalamo-hypophysaire va induire la sécrétion des hormones de stress par les glandes surrénales. Le cortisol est une molécule de la classe des glucocorticoïdes produite par les glandes surrénales, tandis que l'adrénaline est une catécholamine à la fois produite par les surrénales et par le système nerveux central. L'adrénaline est plutôt considérée comme étant une hormone de stress « aigu », libérée rapidement, qui possède des mécanismes d'actions rapides au travers de sa fixation sur les récepteurs adrénergiques. Son activité est indispensable à la mise en place des réponses physiologiques de stress (augmentation du rythme cardiaque, etc...). Selon leur quantité et leur fréquence de synthèse, l'action des hormones de stress dans le système nerveux central possède des effets à la fois favorables et défavorables à l'activité cérébrale, à la façon d'une courbe en cloche. En effet, selon leur fréquence et quantité de synthèse, elles favorisent la mise en place de la plasticité synaptique, de l'augmentation de l'arborisation dendritique et peut améliorer la mise en place de la mémoire (Pugh et al., 1997).

Le cortisol, quant à lui, possède des effets physiologiques plus discrets et plus durables dont l'exposition chronique à des effets délétères, puisqu'une concentration élevée en adrénaline et/ou cortisol altèrent la neurogénèse, modifient la densité des épines dendritiques dans l'hippocampe et le BLA (hypotrophie ou hypertrophie), et favorisent l'expression des récepteurs NMDA dans les cellules hippocampiques (Gazzaley et al., 1996), en particulier les récepteurs possédant les sous-unités NR2A et NR2B qui, on le rappelle, sont restructurés au cours du développement cérébral. Toutes ces modifications de la fonctionnalité des récepteurs NMDA et de la transmission excitatrice perturbent ainsi la fonctionnalité des structures, et induisent des altérations comportementales (McEwen 1999, revue).

A. Altérations de la morphologie des structures du circuit APH en situation de stress

Chez le rongeur adulte, le stress chronique par contention forcée favorise le développement de l'arborisation et des épines dendritiques dans l'amygdale, ce qui a été associé à une augmentation de son volume et de sa réponse aux éléments aversifs (Liberzon et al., 1999; Rauch et al., 2000; Shin et al., 2006; Tottenham et al., 2010; Vyas et al., 2004; Vyas et al., 2002; Vyas et al., 2003). Mitra et collaborateurs en 2005 ont montré que le stress chronique chez le rat induit une hypertrophie de l'arborisation dendritique et des embranchements dans l'amygdale, associés à une augmentation du nombre d'épines dendritiques visibles jusqu'à 21 jours après la fin du protocole de stress (Mitra et al., 2005). A l'inverse, l'hippocampe et le cortex préfrontal subissent des altérations de leur structure avec une diminution globale de leur volume et de la densité des épines dendritiques (Margarinos et al., 1997). De manière intéressante, les effets du stress sont réversibles pour l'hippocampe et semblent quasi-irréversibles pour l'amygdale, lorsque le stress chronique n'est plus appliqué (Vyas et al., 2004). Le stress semble donc altérer particulièrement la structure et la fonctionnalité de l'amygdale sur le long terme et les mécanismes exacts de cette vulnérabilité restent encore à approfondir. Toutefois, les hypothèses fonctionnelles ont été documentées dans la revue de Zhang et collaborateurs en 2018, dans laquelle il est supposé que le stress impacte l'activité de l'amygdale au travers de nombreux éléments (Zhang et al., 2018). En effet, le stress altèrerait la transmission inhibitrice en diminuant son activité de manière durable, laissant ainsi apparaître une hyper-réactivité de l'amygdale en réponse à des stimuli aversifs. Également, en dérégulant la transmission excitatrice, le stress perturbe la fonctionnalité des voies de signalisation associées à la plasticité synaptique et à la croissance dendritique (BDNF, mTOR, MAPK), ce qui aboutit aux altérations morphologiques. De plus, une dérégulation constitutive de l'activité entre l'amygdale et le système hypothalamo-hypophysaire, ainsi qu'avec l'hippocampe et le mPFC par une absence de rétro contrôles inhibiteurs, seraient, ensemble, responsables des altérations morphologiques et d'activité de l'amygdale observées sur le long terme.

Enfin, concernant les effets du stress sur la structure du mPFC, nous savons que c'est une région riche en récepteurs aux glucocorticoïdes, et sa fonction et la morphologie de ses cellules sont également modulées par les concentrations élevées en hormone de stress. Des injections quotidiennes de corticostérone (l'analogue rongeur du cortisol humain) pendant 3 semaines chez le rat induisent une réorganisation des dendrites des cellules pyramidales localisées dans les couches II et III du mPFC (Wellman, 2001), caractérisée par une diminution de l'arborisation dendritique dans les parties distales des neurones et une augmentation de cette densité dans les parties proximales. Ceci suggère que la fonctionnalité des neurones corticaux est différentiellement altérée lorsque les taux de corticostérone sont élevés, pouvant ainsi modifier leur excitabilité au niveau local (proximal) ou sur de plus longues distances (distales). Il a également été montré chez le rat adulte que, suite à des protocoles de stress chronique par contention, l'arborisation dendritique des cellules pyramidales des couches II et III du mPFC étaient atrophiées, ce qui est reflété par une diminution significative de la taille et du nombre d'embranchements des dendrites apicales, mais pas basales (Cook et Wellman, 2004). D'autres études ont ainsi montré que les stress chroniques, moyens ou aigus ont comme conséquences une rétractation des dendrites et une diminution des épines dendritiques du mPFC, résultant en une hypotrophie de la structure (Brown et al., 2005; Radley et al., 2009). Ces effets ont été en particulier relevés au sein du cortex infralimbique, associés à une résistance à l'extinction de peur conditionnée chez la souris (Izquierdo et al., 2006).

Une seconde étude a vérifié les effets du stress sur l'IL chez le rat. Suite à un stress aigu après apprentissage conditionné, les animaux ont présenté une résistance à l'extinction de peur conditionnée au son, ainsi que de sa mémoire 24h plus tard. Pour les animaux stressés les dendrites apicales du cortex infralimbique étaient significativement plus courtes à la fois pour les neurones des couches superficielles et des couches plus profondes (Moench et al. 2016). Ainsi les résultats de cette étude suggèrent que le stress, aigu ou chronique, altère drastiquement la morphologie des neurones, en particulier au sein du cortex préfrontal. Au niveau du cortex infralimbique, une diminution de la densité des épines dendritiques est corrélée avec l'intensité de freezing lors de l'extinction, suggérant un déséquilibre dans la connectivité entre le mPFC et le BLA en situation de stress. Il a par ailleurs été démontré en 2003 qu'après application d'un stress aigu (plateforme surélevée), les stimulations téaniques du BLA n'induisaient plus de potentialisation à long terme dans le CA1 hippocampique, ni dans

le mPFC (Maroun et Richter-Levin, 2003), suggérant que le stress impactait fortement la fonctionnalité du circuit de la peur, entraînant des déséquilibres d'activité et des manifestations comportementales spécifiques.

En conclusion, chez l'animal adulte, le stress aigu ou chronique altère la fonctionnalité de l'amygdale, de l'hippocampe et du cortex préfrontal au travers de l'action des hormones de stress. Ces molécules agissent sur les voies de signalisation impliquées dans la mise en place de la plasticité synaptique et de la potentialisation à long terme, et une altération de ces voies provoque des déséquilibres de la neurotransmission, une hypertrophie de l'arborisation dendritique des cellules principales de l'amygdale, associée à une hypotrophie de celles de l'hippocampe et du cortex préfrontal. Ensemble, ces déséquilibres d'activité semblent favoriser l'apparition de troubles anxieux ou dépressifs, mais induisent également une résistance à l'extinction de la peur. Nous pouvons constater que ces altérations ont été observées dans le cerveau mature (adulte) et qu'à elles seules, elles sont capables d'induire des perturbations massives. Dans un cerveau immature, ces modifications peuvent influencer grandement le développement des structures cérébrales, en particulier celles qui mûrissent plus tardivement, et provoquer les altérations comportementales décrites dans la partie 1 de cette introduction.

B. Conséquences du stress chez le juvénile et l'adolescent, et des troubles émotionnels associés, sur la fonctionnalité du circuit APH.

Au cours du développement cérébral précoce, on sait que le stress chronique altère le développement et la morphologie du cortex préfrontal et de l'amygdale. En effet, des études IRM ont montré que, chez des enfants ayant subi des stress précoces, l'activité de l'amygdale pouvait être fortement augmentée associée à une augmentation de son volume et à une absence de contrôle négatif du cortex préfrontal médian (Casey et al., 2010), avec une réduction de la densité de la matière blanche entre les deux régions (Govindan et al., 2010). De manière générale, ces enfants présentaient des niveaux de stress et d'anxiété élevés, avec des déficits de régulation du comportement émotionnel persistants sur plusieurs années (Casey et al., 2005; Tottenham et al., 2010). Enfin, similairement aux études sur l'Homme adulte et sur les modèles animaux (Vyas et al., 2004), l'activité et le volume du cortex préfrontal médian et de l'hippocampe étaient rétablis pour les enfants testés qui n'étaient plus confrontés au stress chronique, tandis que le volume de l'amygdale restait plus important par rapport aux enfants non-stressés. Les conséquences du stress juvénile sur la morphologie et l'activité des structures du circuit de la peur, en particulier l'amygdale, sont donc notables et durables dans le temps.

L'adolescence étant marquée par l'activation du système hypothalamo-hypophysaire (HH) gonadotrope, les sécrétions hormonales qui en résultent sont modifiées et diffèrent entre le juvénile, l'adolescent et l'adulte, y compris pour la sécrétion de la corticostérone. Chez le rat, le taux de sécrétion basal de corticostérone atteint des niveaux comparables à l'adulte entre PN21 et PN28, avec une maturité fonctionnelle globale des glandes hypothalamo-hypophysaires à PN60. En raison de l'immaturation des structures qui régulent l'activité de l'axe HH par des rétrocontrôles négatifs (hippocampe et cortex préfrontal), la sécrétion de corticostérone pendant la phase précoce d'adolescence en réponse à un stress possède une activité plus prolongée par rapport aux animaux adultes (McCormick et Mathews, 2007). Ainsi, l'axe HH est plus sensible au stress et son inhibition est plus lente à l'adolescence. Par exemple, des études de Romeo et collaborateurs en 2006 ont montré que la répétition d'une contention forcée déclenchait une sécrétion de corticostérone significativement plus élevée chez des rats âgés de PN28-30 par rapport aux rats adultes (Romeo et al., 2006). Il a été précédemment

montré que l'exposition chronique au stress chez le rat adulte diminuait l'activité de l'axe HH par des mécanismes d'habituation et de rétrocontrôles négatifs, qui semblent donc moins efficaces chez le rat adolescent (Girotti et al. 2006, revue).

Une étude de stress induit chez le juvénile a mesuré les conséquences d'une séparation maternelle aigue (une fois à PN14 ou PN21) ou prolongée (3h par jour entre PN14 et PN21) sur l'expression de la protéine c-FOS dans les structures limbiques (hypothalamus, amygdale, hippocampe) et corticales (prélimbique, orbital) à PN21 (début de l'adolescence). Les résultats ont montré que les animaux ayant vécu une séparation maternelle prolongée ou aigue présentaient des taux de c-FOS plus élevés que les animaux contrôles (non séparés), en particulier dans le cortex prélimbique et orbital, le CA1 et CA3, le BLA et l'hypothalamus (Horii-Hayashi et al., 2013). Ainsi, un stress durant la période juvénile est capable d'augmenter de manière durable l'activité des cellules qui appartiennent aux structures impliquées dans le stress, la peur, la mémoire et l'anxiété. Cependant, les auteurs n'ont pas étudié les effets d'un stress subi au cours de l'adolescence.

D'autres études ont mesuré les effets de stress chronique par contention chez des rats mâles et femelles adolescents entre PN30 et PN52, et ont étudié les conséquences sur les taux circulants de corticostérone à PN70 et sur la neurogénèse hippocampique à PN90. Les auteurs ont ainsi montré qu'à l'âge adulte, seules les femelles présentaient des taux élevés de corticostérone basale, associés à une réduction du nombre de cellules en prolifération dans l'hippocampe, suggérant des altérations de la neurogénèse adulte. À l'inverse, les mâles présentaient des taux de corticostérone circulants plus élevés que les femelles à l'adolescence, rétablis à l'âge adulte sans effets notables sur la neurogénèse hippocampique. Ces résultats suggèrent que le stress au cours de l'adolescence altère la fonctionnalité de l'axe HHA et la neurogénèse hippocampique de manière différentielle en fonction du genre et de l'âge (Barha et al., 2011). De manière similaire, Brydges et collaborateurs en 2014 ont réalisé des protocoles de stress sur des souris âgées de PN25 à PN27 (fin de la période juvénile / adolescence précoce) et ont évalué leur anxiété à l'âge adulte (PN99) (Brydges et al., 2014). Les résultats ont montré que les souris stressées à l'adolescence présentaient une anxiété plus élevée au labyrinthe en croix surélevée, de manière plus importante pour les mâles que pour les femelles.

Au niveau de l'excitabilité des neurones du BLA, des études d'électrophysiologie *in vitro* ont montré que l'application de glucocorticoïdes pendant 20 min sur des tranches d'amygdale de rat Wistar âgés d'environ 30 jours (Janvier lab : indication de poids de 150g, entre PN28 et PN35 jours selon les courbes de poids/âge des rats Wistar) provoque une augmentation de l'expression des récepteurs calciques à haut voltage et une diminution des récepteurs à bas voltage, conduisant à une augmentation de l'amplitude des courants postsynaptiques, sans modification de la résistance membranaire, de la capacitance ou de la constante de déclin. D'autre part, l'expression des protéines du système GABAergique (calbindine, calrétinine) et des récepteurs glutamatergiques (AMPA, mGluR, NMDA NR2A et NR2B) étaient inchangées après exposition aux glucocorticoïdes. Cette étude révèle que les hormones de stress participent à la modulation de l'activité des cellules du BLA en potentialisant les influx calciques, en tout cas sur des animaux adolescents (Karst et al., 2002). Une étude similaire a été réalisée en 2007 par Duvarci et Paré, qui ont mesuré les effets d'une application de corticostérone sur l'activité des cellules de l'amygdale de rats âgés de 3 à 5 semaines (Duvarci et Paré, 2007). La corticostérone a induit une dépolarisation de la membrane au potentiel de repos, associée à une diminution du seuil de dépolarisation, conduisant à une augmentation de la fréquence des potentiels d'actions (spike-frequency). Suite à une stimulation des fibres de la capsule externe de l'amygdale, les auteurs ont révélé une diminution de la transmission GABAergique, reflétée par une réduction des IPSPs évoqués par les récepteurs GABAergiques ionotropiques (GABA_A). Ainsi, dans l'amygdale des animaux adolescents, les glucocorticoïdes potentialisent la transmission excitatrice notamment en diminuant les réponses inhibitrices des récepteurs GABA_A et en augmentant les influx calciques.

Au niveau de la transmission inhibitrice, des auteurs ont évalué la modification des sous unités des récepteurs GABA_A, qui pour rappel mûrissent au moment du développement cérébral par une restructuration de leurs sous-unités qui confèrent des propriétés de transmission différentielles. Pour des rats ayant reçu des protocoles de stress sur 3 jours entre PN27 et PN29, avec un second stress émotionnel appliqué à PN60, les niveaux d'expression des sous unités des récepteurs GABA_A à PN60 ont montré une diminution significative pour les récepteurs alpha 1, qui sont présents dans le BLA mature et une forte augmentation des alpha 2 (présents dans le cerveau immature) à PN60 dans l'amygdale. Ces taux d'expression sont inchangés pour des animaux ayant seulement reçu le stress émotionnel à l'âge adulte. Ces

éléments sont aussi associés à une augmentation du comportement anxieux mesuré dans *l'open field*. Ainsi, le stress au cours de l'adolescence avec un rappel à l'âge adulte favorise l'expression de sous-unités de récepteurs GABAergiques de types immatures. L'exposition au stress chez le juvénile altère donc l'efficacité de la transmission inhibitrice et favorise une sensibilité plus élevée à l'âge adulte de développer des altérations comportementales (Jacobson-Pick et al., 2008).

Cependant, le stress, l'anxiété, le déficit d'extinction de peur conditionnée ou les troubles dépressifs ne sont pas les seules altérations émotionnelles qui peuvent apparaître à l'âge adulte à la suite d'un stress subi au cours du développement. D'autres troubles appartenant à la catégorie des troubles émotionnels peuvent survenir, tels que les troubles bipolaires ou de type « borderline » qui sont marqués par une inadaptation à la gestion des émotions. Des troubles sociaux comme les phobies sociales ou l'agressivité et la violence, qui sont également représentés et qui peuvent apparaître en étant comorbides avec ces troubles précédemment cités. Dans tous les cas, ces dérégulations émotionnelles sont marquées par des déséquilibres d'activité de l'amygdale, du cortex préfrontal et de l'hippocampe.

Pour résumer, lorsque l'on relie les informations discutées jusqu'à présent, nous pouvons dire qu'en raison des changements morphologiques et structurels qui apparaissent à l'adolescence, le cerveau est vulnérable aux éléments stressants puisqu'ils sont responsables de l'apparition de troubles anxieux ou encore de déficits d'extinction de peur conditionnée à l'âge adulte, pouvant être associés à une généralisation de la peur au contexte ou à un stimulus conditionné. Au niveau structurel et cellulaire, le stress altère l'activité de l'axe HHA et la libération d'hormones de stress et modifie l'équilibre entre excitation et inhibition, ainsi que la maturation des synapses et des dendrites qui est déjà perturbée par la réorganisation des réseaux neuronaux durant le développement postnatal. A l'âge adulte, les changements comportementaux qui sont observés dans les modèles animaux de stress au cours du développement cérébral (augmentation de l'anxiété, généralisation de la peur et déficits d'extinction de peur conditionnée, symptômes dépressifs à l'âge adulte) sont qualifiés de types « Syndrome de Stress Post-Traumatique ». Ainsi, nous comprenons mieux comment l'altération de la fonctionnalité du circuit APH au cours de l'adolescence, par le stress ou des protocoles d'activation et d'inhibition de l'activité de l'une des structures composant le circuit, favorisent

l'apparition et/ou le maintien des pathologies liées à des déficits impliquant le circuit de la peur à l'âge adulte. Concrètement, le cerveau termine sa maturation sous l'influence du stress et le développement des projections, la maturation des récepteurs excitateurs ou inhibiteurs, et la fonctionnalité des voies de signalisation se construisent et mûrissent de manière déséquilibrée, tout en se consolidant jusqu'à l'âge adulte.

III. Le syndrome de stress post-traumatique

A. Présentation du syndrome de stress post-traumatique

Le syndrome de stress post traumatique, ou PTSD (pour *Post-Traumatic Stress Disorder*, terme que nous utiliserons) se développe suite à l'exposition à un traumatisme aigu ou répété. Il a été notamment caractérisé chez les militaires qui présentaient ces symptômes au retour de leur mission et qui ne diminuaient pas en intensité avec le temps. Il a été également observé chez les femmes ayant subi des agressions sexuelles ou des individus ayant été maltraités pendant leur enfance. Alors que 50 à 85% des individus sont exposés à un événement traumatique au cours de leur vie, il a été estimé qu'entre 2 à 8% de la population selon les régions du monde peuvent développer un PTSD au cours de leur existence (Atwoli et al., 2015). Il s'agit d'un syndrome, donc par définition d'un ensemble de symptômes qui se manifestent chez l'Homme par des reviviscences de souvenirs (*flashbacks*, cauchemars, pensées intrusives), une hypervigilance et un comportement d'évitement prononcé à tout ce qui peut référer au traumatisme initial. Les individus atteints ressentent une anxiété qui ne s'apaise pas lorsqu'une situation est hors danger, ou lorsque le danger est éliminé. Le PTSD est souvent associé à des troubles de l'humeur pouvant aller jusqu'à la dépression chronique, avec une haute propension à développer des troubles addictifs et des troubles du comportement alimentaire (DSM-V). Le PTSD associe donc les troubles anxieux, les phobies, la dépression, les addictions et les névroses alimentaires (Liberzon et Sripada 2007, revue). Les principales caractéristiques du PTSD concernent la difficulté à atténuer l'intensité de peur par l'exposition répétée et quotidienne d'un environnement non néfaste (éveil émotionnel élevé, résistance à l'extinction)

et d'une haute réactivité et intensité émotionnelle face à un élément contextuel qui rappelle le traumatisme (généralisation de la peur). Ainsi, à l'opposé de la contextualisation, la généralisation de la peur est définie par l'incapacité d'un individu à discerner la valence émotionnelle neutre d'un élément dans une situation rappelant le contexte initial du traumatisme, résultant en une inadaptation des réponses comportementales et somatiques de peur.

Toutefois, tous les individus qui ont subi un traumatisme au cours de leur vie ne développent pas forcément un PTSD, ce qui suggère que des éléments génétiques et environnementaux peuvent aussi influencer le développement du trouble ou prédisposer à le développer. Les études de cohortes ont pu mettre en évidence certains gènes et facteurs épigénétiques qui favoriseraient le développement du PTSD, mais la nature du risque génétique et du traumatisme initial sont tellement hétérogènes et variés que les analyses de cohorte ne permettent pas d'identifier la source de la vulnérabilité de certains individus à le développer. Cependant, il a été montré chez l'Homme que les traumatismes répétés (maltraitements) ou les traumatismes aigus (agressions sexuelles) chez l'enfant sont associés à une sévérité plus forte du PTSD à l'âge adulte comparativement aux individus ayant subi ces mêmes types de stress à l'âge adulte (Fenster et al. 2018, revue), ce qui suggère qu'une vulnérabilité peut être préexistante chez l'individu adulte lorsque ce dernier a subi des stress intenses au cours de son développement cérébral.

B. Caractéristiques neurobiologiques du PTSD

Chez l'Homme atteint de PTSD il a été montré par des études d'imagerie (IRM, PET-Scan, BOLD) que l'amygdale était activée de manière exagérée à la fois lorsque les individus mentionnaient leur souvenir traumatique, mais aussi face à la présentation de bruits ou d'odeurs rappelant le traumatisme, ou encore à la présentation de visages menaçants ou de mots à connotation négative (« viol » ; « tumeur »...), ou en réponse à une stimulation cutanée douloureuse, avec une activation de l'amygdale positivement corrélée avec l'intensité et la sévérité des symptômes (Bremner et al., 2005; Hendler et al., 2003; Liberzon et al., 1999; Protopopescu et al., 2005; Shin et al., 2004; Shin et Handwerker, 2009, revue; Vermetten et al., 2007). En revanche, dans ces études, la présentation de stimuli neutres n'ont pas révélé de différentiels d'activité de l'amygdale entre des participants présentant un PTSD et des participants sains. Dans le PTSD, l'augmentation de l'activité de l'amygdale ne semble donc pas être nécessairement liée à des stimuli relatifs à l'évènement traumatique, puisqu'elle l'est aussi face à des éléments possédant une valence émotionnelle négative. Dans tous les cas, l'amygdale répond de manière exagérée aux stimuli négatifs au travers de différentes modalités sensorielles (odorat, ouïe, vue, toucher) et cognitives (langage, mémoire), qui soulèvent bien un déséquilibre global entre les structures sensorielles, cognitives et l'amygdale. Ainsi, dans ces cas précis, on parlera d'hyper-réactivité amygdalienne, en opposition avec une « hyperactivité ». Dans le premier cas, l'hyper-réactivité correspondrait à une augmentation de l'activité de l'amygdale face à des stimuli possédant une valence émotionnelle négative, mais qui n'est pas présente au niveau basal. On la distingue de l'hyperactivité qui correspondrait à une élévation de l'activité de l'amygdale de manière constitutive, à la fois en réponse à un stimulus et de manière basale. Ces éléments ont toutefois été observés chez l'Homme suite à des études d'imagerie cérébrale, dans lesquelles a été observée une augmentation de l'activité de l'amygdale au repos et en réponse à des stimuli neutres (Brunetti et al., 2010; Chung et al., 2006).

Les principales caractéristiques de la neuro-circuiterie du PTSD est que cette hyper-réactivité amygdalienne est associée à une hypo-fonction constitutive du mPFC, en particulier la région cingulaire rostrale (ACCr), l'homologue du mPFC chez le rongeur, impliquée dans les processus émotionnels (Mohanty et al., 2007; Shin et al., 2009). Cette hypo-activité a été à la fois mesurée lorsque les participants se rappellent leur souvenir traumatique, mais aussi lors de rappels de souvenirs non traumatiques, ou au cours de tâches à valence émotionnelle neutre et au repos, avec une hypoactivité négativement corrélée avec la sévérité des symptômes (Shin et Handwerker, 2009, revue). Au niveau comportemental, il a été montré que les individus atteints de PTSD ont une bonne acquisition de l'extinction de peur mais ont des déficits dans sa rétention mnésique (Fenster et al., 2018, revue; Wicking et al., 2016), qui reflètent l'hypo-fonction du mPFC. Similairement, l'hippocampe se montre à la fois hypo-actif chez les patients, puisque son activité est diminuée au cours de tâches mnésiques émotionnellement neutres, ainsi qu'au cours d'une tâche d'apprentissage de l'extinction, mais son activité augmente lors d'un rappel du souvenir traumatique (Shin and Handwerker, 2009, Revue). Ceci suggère que l'hippocampe favorise le maintien en mémoire du souvenir traumatique, mais ne permet plus de discriminer des contextes sûrs. Au niveau anatomique, l'amygdale est hypertrophiée, tandis que le mPFC et l'hippocampe diminuent de volume, ce qui suggère une diminution de la densité des synapses, des arborisations et des épines dendritiques, et donc une diminution globale de la fonctionnalité de ces deux structures, à l'opposition de l'amygdale qui pourrait être potentialisée. Il est possible que le traumatisme initial ait provoqué une dérégulation chronique de l'activité de l'amygdale, résultant en un déséquilibre global du circuit de la peur. Ainsi, le traumatisme serait un apprentissage de peur, tel que celui observé dans le conditionnement, mais qui résulterait en des déficits d'extinction de peur associés à une généralisation de la peur au contexte ou aux stimuli, suite au manque de contrôle inhibiteur du cortex préfrontal. L'hippocampe, quant à lui, ne permettrait plus de moduler les réponses de peur selon les informations contextuelles et pourrait participer à la consolidation du souvenir traumatique. De par ces dysfonctions dans la fonctionnalité des circuits, le PTSD est qualifié par la communauté médicale et scientifique de « désordre des circuits ».

Chez l'Homme, les facteurs génétiques de prédisposition au PTSD, ainsi que les mécanismes biologiques qui seraient à l'origine du déclenchement de la maladie, ont été étudiés, en particulier sur des cohortes composées de jumeaux monozygotes dont seul l'un des deux individus présente un PTSD, ou chez des enfants atteints dont les deux parents présentent un PTSD. Les recherches ont ainsi montré que le PTSD était un caractère peu héritable et que la proportion d'enfants qui développent le syndrome et dont les deux parents sont atteints de PTSD est grandement variable, la part d'environnement et la qualité de vie étant les principaux déclencheurs du PTSD chez ces enfants. Cela dit, il a été montré que certains variants d'allèles qui codent pour la protéine BDNF (brain derived neurotrophic factor), un facteur de croissance pro-survie et essentiel à la plasticité synaptique, étaient présents chez les patients et que certains isoformes des récepteurs dopaminergiques ou sérotoninergiques sont co-présents entre les individus atteints de PTSD et ceux atteints de dépression sévère ou de troubles addictifs, pouvant ainsi révéler un rôle des neuromodulateurs dans l'apparition de la maladie (Afifi et al., 2010; Nugent et al., 2008; Stein et al., 2002). Des études qui comparent l'activité cérébrale de sujets atteints de PTSD avec leurs jumeaux monozygotes non-atteints ont montré une élévation de l'activité basale du cortex cingulaire antérieur dorsal (ACCd), que les scientifiques considèrent comme étant l'homologue humain de la région prélimbique chez le rongeur (Shin et al., 2009). Ses rôles dans le conditionnement de peur ont été établis à plusieurs reprises, en particulier par Milad et collaborateurs en 2007 qui ont montré chez l'Homme sain que l'activité de l'ACCd était positivement corrélée avec l'expression de la peur conditionnée (présentation d'une couleur associée à un choc électrique sur les doigts) et avec l'intensité du SI (Milad et al., 2007). Ainsi, tout comme l'hippocampe, le mPFC ne serait pas hypo-actif dans son ensemble chez les patients souffrant de PTSD, mais le serait de manière bidirectionnelle (hyper- ou hypo-actif) selon les structures et les tâches cognitives et émotionnelles demandées, avec de potentielles prédispositions à une hyper-activation basale des zones qui favorisent l'expression de la peur. L'hypothèse serait alors que le contrôle inhibiteur du mPFC sur l'amygdale n'est pas suffisant, mesurée au travers d'une hypo-fonction globale de la structure en IRMf, mais que son activité de maintien de l'expression de la peur au travers de l'ACCd en soit potentialisée, révélant une hyper-réactivité spécifique de cette structure.

Enfin parmi les facteurs de prédisposition suggérés, il est supposé qu'une hyper-activité initiale de l'hypothalamus puisse favoriser les processus neurobiologiques qui sous-tendent la symptomatologie (Cohen et al., 2006; Lee et al., 2018; Zhang et al., 2020), qu'un variant allélique codant pour une protéine chaperonne des récepteurs aux glucocorticoïdes (FKBP5), qui modifie l'affinité de la corticostérone pour ces récepteurs, est souvent représenté chez les personnes souffrant de PTSD et ayant subi un traumatisme au cours de leur enfance, révélant ainsi l'importance de l'interaction entre les gènes et l'environnement (Wang et al., 2018). Comme indiqué dans la section précédente, la concentration circulante élevée en cortisol altère la morphologie et l'activité neuronale, résultant en un déséquilibre d'activité des structures cérébrales. Par ailleurs, notons que les altérations morphologiques observées dans les troubles liés à la peur sont semblables à celles observées dans les maladies liées à une hyperactivité de mTOR, à savoir, une augmentation de la plasticité synaptique, de l'arborisation dendritique, du volume des structures en raison d'un manque de contrôle du caractère pro-survie et pro-développement de la voie de signalisation TSC2/mTOR, souvent associés à des troubles anxieux et dépressifs chez les malades. Il serait alors concevable que l'altération de ce type de protéines, engagées dans le développement cérébral, soit également un facteur de prédisposition à l'apparition des troubles émotionnels ou du PTSD.

C. Modèles animaux du PTSD

En raison de la complexité des symptômes qui contribuent au PTSD, en particulier les comorbidités avec la dépression ou les addictions, mais aussi en raison des souvenirs et événements traumatiques qui sont « humains » et individuels, ainsi que le manque de connaissances sur des gènes candidats et la variabilité entre les individus sur la vulnérabilité à développer un PTSD, les modèles animaux qui se développent rendent difficile l'étude de l'émergence du PTSD. Pour ces raisons, des critères sont établis tels que, suite à un protocole de stress aigu qui mimerait un événement traumatique, les animaux doivent montrer des réponses comportementales typiques du PTSD, persistantes dans le temps (déficit d'extinction ou de rétention, généralisation, évitement), avec des réponses comportementales bidirectionnelles (hyper- ou hypo- activité comportementale) et présenter une perturbation de la fonctionnalité des structures altérées chez l'Homme (amygdale, hippocampe, cortex préfrontal) de manière bidirectionnelle (activité augmentée ou réduite) (Whitaker et al., 2014, revue). Mais, tout comme les humains, la variabilité interindividuelle des animaux en réponse à un stress ne permet pas toujours de créer un modèle typique de développement du PTSD. Plusieurs protocoles de stress ont été réalisés pour refléter les caractéristiques physiologiques (altération des connectivités, de la morphologie des neurones, de la fonctionnalité des structures) et comportementales du PTSD (anxiété, hypervigilance, évitement, résistance à l'extinction de peur). Les protocoles les plus communément utilisés chez l'animal, généralement adulte, sont des protocoles de stress chronique incluant la contention, la nage forcée, les chocs électriques répétés ou l'apprentissage de la peur potentialisé par le stress (stress-enhanced fear learning, SEFL), qui consiste en l'application de nombreux chocs électriques dans un contexte donné (événement traumatique), suivi d'un apprentissage conditionné au contexte 24h plus tard dans un contexte inconnu et d'un test de de mémoire 48h après la séance de stress. Dans ce modèle les réponses de freezing sont potentialisées et amplifiées au moment de l'apprentissage et de son rappel, suite au stress subi 24h avant.

Comme nous avons pu le voir jusqu'à maintenant, le stress chronique altère la fonctionnalité du circuit APH et la morphologie des neurones, et peut favoriser le développement de symptômes anxieux ou dépressifs, de manière similaire à ce qui est observé dans le PTSD. C'est grâce à ces études que l'on peut émettre des hypothèses quant aux mécanismes qui sous-tendent les altérations morphologiques observées dans le PTSD. En effet, comme indiqué dans la section précédente, de manière similaire au PTSD, le stress est responsable d'une diminution de la neurogénèse, de l'arborisation dendritique et d'une hypotrophie hippocampique et corticale, en opposition avec l'augmentation globale de l'activité de l'amygdale et de son volume. Les études épidémiologiques ayant montré qu'un traumatisme subi au cours de l'enfance augmentait les probabilités de développer un PTSD à l'âge adulte (Lee et al., 2018, Revue), les altérations de la circuiterie cérébrale par le stress au cours du développement fragiliseraient la fonctionnalité de ces circuits sur le long terme et aboutiraient à l'apparition de la pathologie. De ce que nous avons pu détailler jusqu'à maintenant, les stress appliqués aux juvéniles et adolescents créent des déficits comportementaux et neurobiologiques à l'âge adulte, de manière différentielle selon le type de stress appliqué et peuvent donner une piste quant aux mécanismes d'apparition du PTSD. Puisque le stress à l'adolescence altère durablement la fonctionnalité du circuit APH, il est ainsi imaginable que le circuit soit également vulnérable aux éléments stressants à l'âge adulte, le traumatisme étant un déclencheur du déséquilibre d'activité de ces trois structures.

Parmi les modèles animaux de PTSD, un protocole de stress traumatique a été développé par Richter-Levin en 1998, qui consiste en l'immersion forcée des animaux sous l'eau dans un labyrinthe immergé en O (Richter-Levin, 1998). A la différence de la nage forcée qui induit un stress, l'immersion sous l'eau crée un traumatisme, car il met directement l'animal en danger de mort. Le labyrinthe consiste en une piscine circulaire qui possède des parois non immergées sur lesquelles l'animal peut se réfugier : deux parois ouvertes et éclairées qui se font face et qui exposent l'animal à l'environnement extérieur (anxiogène), et deux parois fermées et sombres à l'opposé l'une de l'autre dans laquelle les animaux s'y sentent en sécurité. Les animaux peuvent ainsi circuler d'une paroi à l'autre soit en traversant la piscine à la nage, soit en y faisant le tour. Ainsi on mesure le temps passé en dehors de l'eau, l'exploration autour de la piscine dans les parois ouvertes ou fermées, ou le freezing et l'inactivité sur les parois non-immersées ouvertes ou fermées. Dans ce modèle, également décrit par l'équipe de

Koolhaas en 2011, les animaux sont réintroduits dans la piscine 1 mois après le traumatisme et montrent des pourcentages de freezing élevés dans les parois fermées par rapport aux parois ouvertes, que les auteurs qualifient de symptôme de type PTSD, puisqu'il suggère un comportement d'évitement prononcé de l'eau (Koolhaas et al., 2011). Ce test a cependant été réalisé dans le même contexte que l'évènement traumatique : un test similaire avec un contexte différent, ou tout simplement un test dans un autre contexte mais en présence d'eau, pourrait être réalisé afin d'observer une potentielle généralisation de la peur à l'eau et/ou un comportement d'évitement. De plus, une exposition répétée au contexte du traumatisme aurait pu être faite dans le but de mesurer l'habituation des animaux à ce contexte, et donc d'en observer une potentielle diminution progressive de l'intensité de peur. Ces éléments simples auraient pu dévoiler d'autres symptômes de type PTSD (généralisation, résistance à l'extinction, évitement) et y apporter des informations supplémentaires quant aux mécanismes d'apparition et de régulation de la pathologie. Également, les auteurs ont montré une élévation de l'expression de la protéine c-FOS dans le BLA et le CeA, ce qui reflète l'intensité de la peur mesurée. Dans une autre étude, Ritov et Richter-Levin en 2014 ont également réalisé ce protocole et testé les animaux 24h plus tard, et ont montré une élévation de la phosphorylation de la voie de signalisation des MAPK – essentielle à la mise en place de la plasticité synaptique et de la mémoire – dans l'hippocampe dorsal et le BLA uniquement pour les animaux ayant subi le traumatisme, et non pour les animaux ayant seulement subi une nage forcée sans immersion (Ritov et Richter-Levin, 2014). Ceci suggère ainsi que l'augmentation de l'activité des protéines kinases dans ces deux structures permet la mise en place de la mémoire à long terme de l'évènement traumatique, et pourrait suggérer que la mise en place de cette plasticité serait une consolidation spécifique de cette mémoire traumatique dans le BLA et l'hippocampe. Ces animaux étaient cependant adultes et n'ont pas vécu d'autres traumatismes au cours de leur développement, suggérant qu'un traumatisme aigu à l'âge adulte pourrait induire à lui seul des symptômes typiques du PTSD chez les animaux.

Ainsi selon les hypothèses actuelles, l'exposition au traumatisme crée une mémoire associative robuste dans l'amygdale et l'hippocampe dorsal, engageant l'activation de voies de signalisation nécessaires à la mise en place de la plasticité synaptique, mais induisant un déséquilibre d'activité entre les structures. L'amygdale est hyper-réactive, résultant en une inhibition du mPFC et de l'hippocampe ventral. Ainsi, la mémoire de la peur reste toujours active et la mise en place de l'extinction et de sa rétention est altérée, associée à des déficits de contextualisation de la part du vHPC. A la fin, l'entièreté du système est déséquilibrée et provoque la symptomatologie typique du PTSD.

Sachant que nous ne savons pas dans la population générale quels seraient les individus qui pourraient développer un PTSD, il est difficile d'en distinguer les personnes à risques et de prévenir son apparition. En termes de psychologie, le PTSD s'oppose à la résilience, qui se définit par la capacité à ne pas développer de troubles psychologiques suite à un traumatisme. Beaucoup de recherches se penchent sur les phénomènes de résilience, et l'amygdale, le mPFC, l'hippocampe et l'axe hypothalamo-hypophysaire en sont les principales structures étudiées. Il a, par exemple, été montré que les individus résilients (humains et animaux) présentent une activité plus faible de l'axe HHA résultant en des taux de cortisol circulants plus faibles, mais aussi une augmentation des transmissions dopaminergique et sérotoninergique dans le mPFC qui permettent de réguler l'excitabilité des cellules, associée à un contrôle inhibiteur GABAergique efficace dans ces structures, et d'une absence de perte de volume du mPFC et de l'hippocampe ou d'une augmentation de l'activité de l'amygdale après un stress aigu. D'autres études d'IRM ont montré qu'après une exposition au stress chez le rat, deux profils comportementaux pouvaient se distinguer : les animaux « vulnérables » qui répondent hautement au stress et ceux qui n'en étaient que peu affectés. Dans le profil vulnérable, des modifications anatomiques et connectiques se distinguaient, en particulier au travers d'une diminution de la matière grise dans les structures associées au circuit de la peur (PL, cortex auditif, hippocampe, thalamus) associé à une augmentation des connectivités fonctionnelles entre ces structures. Ces modifications n'étant pas observées chez les animaux qui répondaient peu au stress (Magalhães et al., 2018). Beaucoup de mécanismes et de pistes sont ainsi dévoilés et permettent de suggérer qu'il existerait bien des mécanismes compensatoires qui empêchent l'altération morphologique et fonctionnelle des structures du circuit (Russo et al. 2012, revue). Chez l'Homme, la résilience est régulièrement documentée dans des études portant sur des

enfants ou des adolescents qui ont subi des stress, maltraitements ou traumatismes, et dont certains ne présentent pas de signes de détresse psychologique, alors que d'autres en sont profondément affectés. Les mécanismes qui sous-tendent le développement ou la prédisposition à développer un PTSD sembleraient donc déjà existants depuis l'enfance et l'adolescence, ce qui soulève ainsi la question du rôle du développement cérébral et du circuit de la peur dans l'apparition de ce trouble.

Ainsi, d'où proviendrait l'origine du développement du PTSD : Est-ce seulement le traumatisme sur un cerveau sain à l'âge adulte qui a induit une hyper-réactivité de l'amygdale et qui a conduit à une dérégulation chronique du circuit ? Dans quelles mesures l'environnement favorise-t-il l'apparition de ces troubles ? Est-ce à cause de l'amygdale déjà hyperactive ou hyper-réactive et hautement sensible en réponse à des éléments aversifs ? Ou du cortex préfrontal qui possède un défaut initial de contrôle inhibiteur ? Est-ce qu'au cours du développement cérébral, l'augmentation seule de l'activité de l'amygdale pourrait être responsable de l'apparition de la symptomatologie à l'âge adulte ?

C'est ainsi qu'ont émergé les questions que nous nous sommes posées lors de l'élaboration de cette thèse : Dans quelle mesure une modification de l'activité de l'amygdale au cours de l'adolescence ou à l'âge adulte peut induire des altérations comportementales et émotionnelles observables plus tardivement dans le développement ? Et quelles sont les bases neurobiologiques de ces altérations et les conséquences sur l'activité du circuit de la peur, en particulier de l'amygdale et du cortex préfrontal.

OBJECTIFS DE LA THESE

Dans cette thèse, nous cherchons (1) à comprendre si une modification sélective de l'activité de l'amygdale au moment de l'adolescence peut être responsable de l'apparition de dérégulations du comportement de peur à l'âge adulte, (2) à préciser la nature de ces troubles, et (3) à déterminer les conséquences sur l'activité et la fonctionnalité des structures associées, avec un focus sur l'impact au niveau du cortex préfrontal. Sachant que de nombreuses études ont montré un effet du stress au cours de l'adolescence sur le comportement et la neurophysiologie à l'âge adulte, nous avons induit une modification de l'activité de l'amygdale, telle qu'elle peut être observée dans les troubles anxieux associés à la sclérose tubéreuse (TSC), sans induire de stress préalable chez les animaux, afin d'en observer les conséquences sur la circuiterie et sur le comportement. En connaissant l'implication des cellules glutamatergiques de l'amygdale dans les processus de peur et des mécanismes cellulaires qui permettent l'induction de la plasticité synaptique (synthèse protéique *de novo*), ainsi que des modifications importantes de la fonctionnalité du circuit au cours du développement postnatal et en particulier au moment de l'adolescence, nous avons induit une augmentation constitutive de l'activité métabolique des cellules glutamatergiques du BLA chez le rat à l'adolescence précoce (PN25) ou tardive (PN50). Pour ce faire, à l'aide d'un vecteur viral, nous avons modifié l'activité des cellules principales du BLA en induisant une diminution de l'activité de la protéine Tsc2, régulateur négatif de la voie mTOR. Comme nous l'avons vu en partie 3 de cette introduction, la voie mTOR est indispensable dans les processus de croissance cellulaire, de prolifération, de synthèse protéique nécessaires au développement des synapses et de l'arborisation dendritique, à la mise en place des récepteurs glutamatergiques aux membranes et à l'inhibition de l'autophagie. Ainsi, nous avons étudié comment une modification de l'activité globale des cellules du BLA pendant ou à la fin du développement cérébral altère le comportement lorsque les animaux sont devenus adultes (PN60 et PN90). Nous nous sommes principalement concentré sur le comportement de peur en utilisant un protocole de conditionnement Pavlovien qui permet d'évaluer les capacités d'habituation, d'apprentissage, d'extinction, de *renewal* et de généralisation de la peur au contexte et au son, et nous avons évalué l'activité des cortex prélimbiques et infralimbiques au travers d'une étude de micro-

anatomie c-FOS qui nous a permis d'isoler des zones anatomiques pouvant être responsables de l'apparition des altérations comportementales observées. Ces dernières, différentielles entre les animaux altérés au début ou à la fin de l'adolescence, suggèrent qu'une altération sélective de l'activité de l'amygdale au cours du développement cérébral peut favoriser le développement de symptômes de type PTSD à l'âge adulte et déréguler l'activité basale du mPFC (**Figure 1.13**).

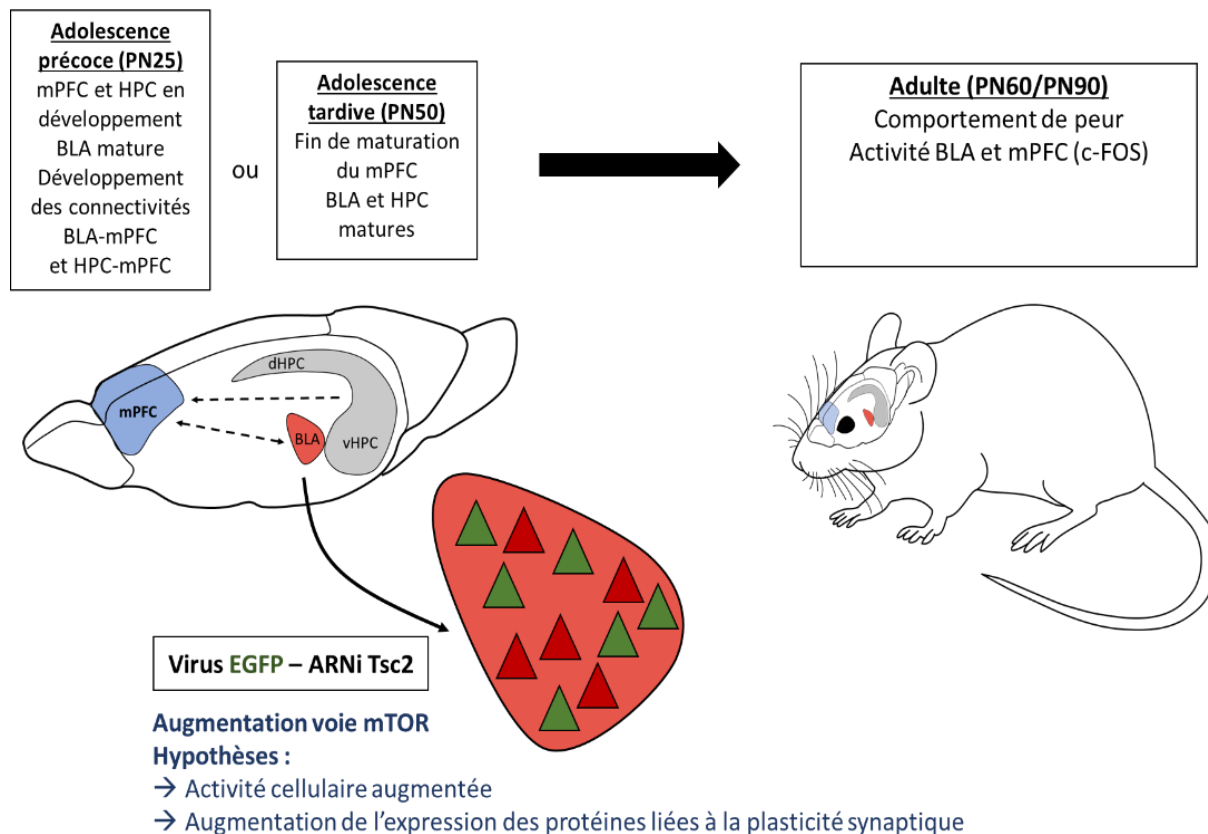


Figure 1.13 : Schéma représentatif du protocole expérimental réalisé au cours de cette thèse

Au cours de l'adolescence précoce (PN25) le mPFC et l'hippocampe n'ont toujours pas terminé leur maturation. La connectivité entre l'amygdale, l'hippocampe ventral et le mPFC, leurs interactions fonctionnelles et l'efficacité des voies de signalisation relatives à la mise en place de la plasticité synaptique poursuivent leur maturation. A l'adolescence tardive (PN50), le BLA et l'hippocampe sont matures tandis que le mPFC poursuit ses processus de maturation (élagages, apoptoses) et tend vers une structure et une fonctionnalité de type adulte.

A ces deux stades de développement, afin d'évaluer l'influence de l'âge à laquelle l'altération de l'amygdale est effectuée, nous modifions l'activité des cellules pyramidales du BLA grâce à un vecteur viral qui exprime un ARN interférant (ARNi) anti Tsc2 et l'EGFP comme marqueur fluorescent, dont les cellules transduites sont représentées ici en vert. L'hypothèse est que nous augmentons l'activité des cellules pyramidales transduites, notamment au niveau de l'expression des protéines liées à la plasticité synaptique

Sept semaines plus tard, lorsque les animaux ont atteint l'âge adulte (PN60 pour les animaux injectés à PN25, ou PN90 pour les animaux injectés à PN50), la fonctionnalité du circuit APH est évaluée en soumettant les rats à un protocole de conditionnement Pavlovien. Sept semaines plus tard, l'activité basale du BLA et du mPFC est étudiée à l'aide d'une quantification de la protéine c-FOS dans ces structures

CHAPITRE 2

IMPACTS D'UNE MODULATION DE LA PROTEINE
TSC2 DANS L'AMYGDALE CHEZ LE RAT A
L'ADOLESCENCE PRECOCE ET TARDIVE SUR LE
COMPORTEMENT DE PEUR ET L'ACTIVITE DU
CORTEX PREFRONTAL MEDIAN A L'AGE ADULTE

Article: Disruption of amygdala Tsc2 in adolescence leads to changed
prelimbic cellular organization and generalized fear responses at
adulthood

**Fanny Joly¹, Pauline Jeckel² Martin Kriebel², Nicole El Massioui¹, Cyrille Vaillend¹, Luke
R. Johnson^{3,4}, Hansjürgen Volkmer² & Valérie Doyère¹**

¹Université Paris-Saclay, CNRS, Institut des Neurosciences Paris-Saclay (NeuroPSI), UMR9197, Gif-sur-Yvette 91190, France

²Natural and Medical Sciences Institute at the University of Tübingen, Markwiesenstr. 55, 72770 Reutlingen, Germany

³School of Psychological Sciences, College of Health and Medicine, University of Tasmania, Launceston, TAS, 7250, Australia

⁴Centre for the Study of Traumatic Stress, Department of Psychiatry, Uniformed Services University School of Medicine, Bethesda, MD, 20814, USA

Corresponding authors: Fanny Joly (jolyheno.fanny@gmail.com) and Valérie Doyère (valerie.doyere@universite-paris-saclay.fr)

ABSTRACT

Adolescence is a highly sensitive period characterized by massive brain changes, especially in the developing connectivity between the early maturing amygdala and the late maturing prefrontal cortex (PFC), critical for fear learning and its expression. This window of vulnerability to genetic and environmental factors may predispose to the emergence of fear-related disorders at the adult age, such as post-traumatic stress disorder (PTSD). In the present study, we tested whether a constitutive knock-down of tuberous sclerosis complex 2 (Tsc2), a negative regulator of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and risk gene for neurodevelopmental disorders, in the basolateral amygdala (BLA) from adolescence could alter fear network functionality and create a vulnerability ground to fear-related disorders at adulthood. We compared the impact of a bilateral injection of a lentiviral vector expressing a miRNA specific for Tsc2 mRNA in the BLA of adolescent (PN25) or young adult (PN50) rats on BLA and PFC functionality at adult age by measuring (1) basal expression of immediate early gene (IEG) c-FOS, and (2) fear behavior, through a Pavlovian auditory fear conditioning protocol. We show that rats altered from adolescence present at adult age an increased activity in middle layers of the prelimbic cortex in correlation with a PTSD-like behavior, expressed as a resistance to fear extinction and overgeneralization of fear to a safe unconditioned stimulus. We suggest that a developmental dysfunction of the amygdala could play a role in the vulnerability to PTSD emergence at adulthood. We propose our methodology as an alternative to model vulnerability to PTSD, especially in its comorbidity with TSC2 related autism syndrome.

1. Introduction

Postnatal brain maturation is a critical step marked by the functional maturation of corticolimbic structures from the juvenile to adult age. Intense maturational processes occur during adolescence, which is recognized as a window of vulnerability to genetic and environmental factors, during which dysfunctional maturation mechanisms may be responsible for the genesis of neurodevelopmental disorders, such as autism spectrum disorders (ASD) or schizophrenia (Bale et al. 2010; Bhutta and Anand 2002; Fusar-Poli et al. 2011; Herbert 2010; Rice and Barone 2000). These neuropsychiatric disorders are extensively studied, and candidate genes have been progressively identified. Environmental factors during this developmental period also have a critical impact on brain and cognitive functions in the adult. Indeed, stressful events during the juvenile or adolescent periods lead to the appearance of emotional and cognitive disorders that may include generalized anxiety, phobias and post-traumatic stress disorder (PTSD), which may worsen as they consolidate at the adult age (Avital and Richter-Levin 2005; Bick and Nelson 2016; Tzanoulinou et al. 2014). If the stressed adolescent does not show pathologic signs immediately, it may be predisposed to develop PTSD during adulthood when exposed to a new insult (Chaby et al. 2020; Cloitre et al. 2009; Tsoory et al. 2007). Interaction between genes and environmental factors is also highlighted through the heightened risk of PTSD in adults with ASD (Haruvi-Lamdan et al. 2020; Rumball et al. 2020).

It is currently believed that emotional disorders are due to an imbalanced functionality of the fear circuitry, a highly interconnected network of brain structures that follows a non-linear developmental pattern from juvenile to adulthood (Bouwmeester et al. 2002; Cressman et al. 2010a; Uematsu et al. 2012). The amygdala is a core structure viewed as a major hub within the network underlying associative fear learning and fear expression. The circuit comprises the medial prefrontal cortex (mPFC), especially the prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortices that respectively promote and inhibit fear expression, and the hippocampus (HPC) that drives the processing of contextual information to the mPFC and the amygdala, in order to regulate fear behavior and fear memories (Ledoux 1996; Ledoux 2000; Sierra-Mercado et al. 2011b). Importantly, the precocious functionality of the amygdala appears to be critical for the development of a balanced activity of the brain structures with later maturation within the fear network, in particular its connectivity with the prefrontal cortex, one of the latest maturing brain area (Tottenham and Gabard-Durnam 2017). The integrity of the amygdala, affected by a stressor in the young, may be directly responsible of the appearance of emotional and executive disorders in the adult (Cisler et al. 2016; Hermans et al. 2014; Johnson et al. 2018; Kaiser et al. 2018; Márquez et al. 2013).

The functional outcomes of a disturbance of the amygdala-prefrontal (AP) network have been described in relation with the post-traumatic stress disorder (PTSD). PTSD is characterized by a mosaic of symptoms comprising re-experiencing the trauma (reviviscences, flashbacks), hyperarousal (exaggerated fear response, hypervigilance, anxiety), active avoidance behavior and an overgeneralization of fear, which is defined as a high level of fear responses to a stimulus not related to the initial aversive event (Fenster et al. 2018; Liberzon and Sripada 2007; Rauch et al. 2006). Individuals with PTSD display a modified amygdala, reflected by changes in volume, a disruption of excitatory neurotransmission, and overdevelopment of dendritic arborization (Bremner et al. 2007; Morey et al. 2012; Neves et al. 2019; Pavliša et al. 2006; Shin and Handwerker 2009). PTSD is also frequently associated with a dysfunctional mPFC, characterized by structure volume decrease, neuronal loss, decreased dendritic arborization and reduced synaptic plasticity (Shin and Handwerker 2009; Whitaker et al. 2014). Epidemiological studies report that only 2-8% of individuals exposed to a trauma develop PTSD, highlighting singular vulnerabilities. Precocious detrimental environmental and/or genetic factors may predispose subjects to a disruption of the AP circuit integrity, grounding for a potential development of a PTSD following later traumatic exposure. However, there is a lack of knowledge regarding subjects' AP functionality and history before the appearance of PTSD. Moreover, the high inter-individual variability in the development of the syndrome, the nature of the trauma experience and the constellation of associated symptoms make construction of a specific animal model for PTSD difficult. A current option to develop a rodent model of PTSD is based on the exposition of animals to intense stressors through specific protocols (stress-enhanced fear learning, Water O-Maze with forced immersion), which tend to mimic the consequence of AP network's disruption (Fenster et al. 2018; Ritov and Richter-Levin 2014; Ronzoni et al. 2016; Whitaker et al. 2014). Alike humans, rodents with PTSD-like symptoms show higher level of fear, extinction deficits and overgeneralization of fear, but with high inter-individual variabilities. Moreover, to the best of our knowledge, it is still unknown whether the mechanisms underlying PTSD involve predisposition factors, such as a preexisting imbalance in the amygdala-prefrontal network, due to an initial hyper-function of amygdala and/or a dysfunction of the mPFC.

To address this question, in the present study we have developed an alternative rat model based on a local modulation of the mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) signaling pathways, in order to promote cell activity selectively in the amygdala during postnatal brain maturation. Interestingly, in the tuberous sclerosis complex (TSC) genetic disorder a reduced activity of TSC1/TSC2 proteins complexes results in the constitutive hyper-activation of the mTOR signaling pathway (Li et al. 2004). This disorder is characterized by a sustained excitatory drive, thus promoting epileptic status and appearance of anxiety, depression and

ASD-like syndromes in two third of patients (Hoeffler and Klann 2010; Li et al. 2004). Here, we used a stereotaxic injection of a viral construct designed to induce a constitutive knock-down of Tsc2 expression (Tsc2-KD) in CamKII-positive neurons within the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) at different stages of brain development (adolescence or young adulthood) in the rat. Then, we evaluated the integrity of the AP network when rats reached adulthood, searching for specific changes in the AP network activity, and disturbances of fear processing reminiscent of PTSD-like symptoms, especially when BLA Tsc2-KD was induced from early adolescence. Fear processes were analyzed using a Pavlovian auditory fear conditioning protocol, while the basal neuronal activity of the BLA and mPFC was evaluated through the expression analysis of the immediate early gene c-FOS. We report that rats whose amygdala was disrupted during adolescence present a resistance to fear extinction and an overgeneralization of fear associated with a basal hyper-activity specifically in deep and middle layers of the PL cortex. This therefore suggests that an experimental modulation of a signaling pathway crucial for brain development in the amygdala while the AP network is still developing may create a vulnerability to PTSD when exposed to an environmental insult during the adulthood, which constitutes an interesting alternative to model PTSD, especially regarding its comorbidity with Tsc2 related ASD.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

A total of eighty-nine male Sprague Dawley rats (Envigo, France) was used. Rats were housed in Plexiglas cages (three to four per cage) in a 12/12h light-dark cycle (7am-7pm) with controlled temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and hygrometry ($55 \pm 5\%$), and water and food *ad libitum*. Cages were enriched with tunnels, wood sticks and two types of litter (wood chip and sawdust), allowing them to dig and hide. All rats were handled and weighed daily. Experimental procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the European Communities Council Directive (2010/63/EU Council Directive Decree) and the Paris-Centre et Sud Ethical Committee (CEEA N°59). All efforts were made to reduce the number of rats used and to minimize their suffering.

Two groups of different ages were used: Forty-four rats were young adults, weighing 280 ± 20 g at arrival in our facility; they underwent surgery at postnatal day 50 (PN50) and constituted the “PN50_inj” group. Forty-five rats were adolescent at the time of surgery and constituted the “PN25_inj” group. In the PN25_inj group, rats were either purchased when adolescents, weighing 70 ± 10 g at their arrival, or eleven of them were born in the laboratory from four gestating females (arrival in our facility at 7 days of gestation weighing 280 ± 20 g at arrival). Gestating females were in a separate room and housed alone in a cage until pups weaning. Cage litters were supplemented with cellulose paper, and breeding-specific food was given to mother and pups to provide them all the nutrients necessary for gestation and growth. Four weeks after birth, rats were weaned and separated from their mother and female siblings, and randomly assigned to an experimental group.

2.2 Viral preparation and viral efficacy analysis

The lentiviral preparations were produced at the Natural and Medical Sciences Institute at the University of Tübingen (NMI; Reutlingen, Germany). The general vector construct and layout was previously described in (Kriebel et al. 2020) (<https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00043>) and is summarized in **Figure 2.1a**. All lentiviral vectors expressed the Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) protein under the control of a synapsin promoter. Active lentiviruses also expressed a micro-interferent RNA (miRNA) directed against Tsc2 mRNA, under the control of the Ca^{++} -Calmoduline Kinase II (CaMKII) promoter. The miRNA targeted a specific mRNA sequence of the Tsc2 mRNA in order to diminish Tsc2 expression levels in CaMKII producing cells, thus creating a constitutive and CamKII-restricted knock-down of TSC2. Two target sequences for the Tsc2-miRNAs were used: Vector 1 (Vir1_Tsc2) sequence was TCATAGCCATGTGGTTCATTA; vector 2 sequence

(Vir2_Tsc2) was GGATGGATGTTGGCTTGCCT. As a control, a lentiviral vector expressing a negative control miRNA from pcDNATM6.2-GW/miR-neg (Thermo Fisher Scientific, USA) was constructed (Vir_ctrl). Titers of corresponding lentiviral suspensions were at least 5×10^7 Transduction Units (TU)/mL. Vector knock-down (KD) efficiency on Tsc2 protein level was first evaluated *in vitro* by quantitative immunocytochemistry in primary hippocampal neurons, based on the intensity of anti-Tsc2 immunoreactivity (IR) in somata of successfully transduced neurons (i.e., EGFP-positive neurons). KD efficiency was also confirmed at the mRNA level, evaluated by qRT-PCR using duplicate samples from rat primary cortical neurons transduced by the vectors, as previously described (Kriebel et al. 2011, 2020; Saha et al. 2017) (**Figure 2.1**).

2.3 Surgery and viral infusion

According to the growth guideline of Sprague Dawley rats provided by animal provider (Envigo, France), the PN50_inj rats had surgery at 300 ± 10 g and PN25_inj rats at 100 ± 5 g.

Surgery preparation

Twenty minutes before surgery, rats were isolated in a cage under a heating lamp. PN50 animals received a sub-cutaneous injection of the analgesic, tolfedine (Tolfedamic Acid, 4mg/kg), followed by anesthesia with an intra-peritoneal (i.p) injection of a mix of ketamine (Imalgene® 1000, 70mg/kg) and Metedomidine (domitor®, 0.5mg/kg) diluted in 9% NaCl. According to veterinary recommendations, PN25 rats received the same anesthesia protocol with a dose reduced by 2/3 compared to PN50 rats to limit overdose risks. When necessary, a half dose of ketamine/metedomidine was supplemented at mid-surgery. The rat's body temperature was controlled and maintained during surgery with a warming pad, and the eyes were protected from dryness by calboprol creme (OcryGel). At the end of surgery, the wound was closed with surgical staples (Michel 100, 7.5 x 1.75 mm) after applying lidocaine/prilocaine ointment (Anesderm Gé) to limit pain during waking up. Rats were awakened with an intramuscular injection of Atipamezole (Antisedan®, 1mg/kg for PN50 and 0.67mg/kg for PN25) diluted in 9% NaCl, and returned to home cage once fully awake.

Viral infusion

Rats were randomly assigned into different experimental groups, with no more than 2 adolescents from the same litter in a viral condition group. Once rats were placed in a stereotaxic apparatus (Stoelting, USA), a midline incision was made onto the scalp and holes were made in the skull with a dental drill (Bravo Micromotor portable III, Hager Worldwide) for bilateral injection of the lentiviral preparation into the BLA. Cannulae (26G; Phymep, C3115I)

were slowly lowered at the following stereotaxic coordinates for PN50 rats (Anteroposterior (AP): -2.64mm; Mediolateral (ML): \pm 4.6mm relative to Bregma ; Dorsoventral (DV): -6.8mm relative to the surface of the brain; Paxinos & Watson, 2009), and for PN25 rats (AP: -2.9mm; ML: \pm 4.8mm relative to Bregma ; DV: -6.8mm relative to the surface of the brain (Khazipov et al. 2015). Five min after reaching final coordinates, injections were performed using a 10 μ l Hamilton Syringe (Hamilton 801 N) with an automated pump (Harvard Apparatus, Pump II Elite, Harvard Bioscience, Inc) delivering 2 μ l of lentiviral preparation bilaterally at 0.05 μ l/min. The cannulae were progressively withdrawn from the brain 10 min after the end of the infusion.

2.4 Behavioral assessment: Fear conditioning

Apparatus: Four identical conditioning chambers (30 x 25 x 30 cm, Coulbourn Instruments, USA) were used, enclosed within a sound-isolation cubicle with a ventilation fan producing a background noise of 60dB. All rats were pseudo-randomly assigned to each conditioning chamber so that every chamber received the same number of Vir_ctrl, Vir1_Tsc2, or Vir2_Tsc2 animals. Protocols were designed using the Graphic State 3.02 software (Coulbourn Instruments, USA). Two different contexts were used in distinct phases of the experiment. For context A, each chamber was equipped with a grid floor for delivery of electrical footshocks, a red light located at the top right corner and a speaker at the top left corner of the box. The context B took place in the same conditioning chambers, but with a green light, peppermint odor (Sigma-Aldrich, ref 77411) and a smooth floor with wood litter. Between rats, each chamber was cleaned with water and cellulose tissue, and wood litter was changed. Between days, each chamber was cleaned with 70° alcohol. Each chamber was equipped with an infrared camera (Coulbourn Instruments, USA) placed above the conditioning chamber and connected to a television screen and a DVD recorder. Infrared cues (Coulbourn Instruments, USA) lighted up during the tone presentations to allow the experimenter to recognize the tone periods for off-line scoring.

Protocol : Seven weeks after vector infusion, animals were tested for fear behavior using a Pavlovian auditory fear conditioning paradigm constituted of five sessions spaced by 24 h. Each session lasted from 30 min to 70 min depending on the protocol, and the inter-trial interval (ITI, from the end of a stimulus to the onset of the next one) of 3 min \pm 1.5 min presented in pseudorandom order in each session. At the start of each session, there was a variable period of time, from 2 to 5 min (3 min in average among the 5 sessions), before the apparition of the first tone.

Habituation: On Day 1, familiarization to the Context and Tone was achieved by the delivery of 5 conditioned stimuli alone (CS: 30s, 4 kHz, 80dB) in Context A.

Fear Learning: On Day 2, classical fear conditioning was assessed in context A. During this phase, rats received 7 CS paired with an electric foot-shock (unconditioned stimulus, US, 0.5 mA, 0.5s) delivered immediately at the end of the CS presentation.

Extinction and Extinction Recall: On Day 3, 20 presentations of the CS alone were given in the new Context B (extinction session), followed 24h later (Day 4) by a session evaluating extinction recall by means of 5 presentations of the CS alone, in context B as well.

Renewal and Generalization: On Day 5, renewal of fear was tested by placing the rats back in the original learning context, context A, with 5 presentations of the CS alone. The generalization of fear to a new tone was then tested, after 4 min, with 5 presentations of an unknown and distinct tone (30s, 11 kHz, 75dB).

Analysis: Fear intensity was evaluated by measuring by off-line quantification of freezing behavior, an instinctive reaction of tonic immobility in response to a threat in rodents, defined by an absence of movement, except respiratory (R. J. Blanchard and Blanchard 1969; Sigmundi, Bouton, and Bolles 1980). The percent time freezing to the context alone and during the 30s tones was manually recorder for each session; the experiment and scoring was done blind regarding experimental groups. Due to a technical issue, the freezing behavior could not be scored for some rats (PN50_inj groups on Day 1: 2 Vir_ctrl and 4 Vir1_Tsc2; PN25_inj groups on Day 3, between tone 6 to tone 15: 1 Vir_ctrl and 5 Vir1_Tsc2). As a result, fear memory and extinction during Day 3 was statistically assessed by analyzing freezing behavior during the first 5 trials and the last 5 trials, respectively.

2.5 Biochemical and molecular studies

Seven weeks after fear conditioning, rats were deeply anesthetized with a high dose of sodium pentobarbital (i.p., Dolethal, 1mL/100g; diluted 1/3 in 9% NaCl) and then perfused intracardially at 25 rpm with 300 ml Phosphate buffered saline (PBS, 0.1M), followed by 300ml of 4% paraformaldehyde at room temperature (RT). The brains were removed and stored in the same fixative solution for 24h at 4°C, and then successively immersed for three consecutive days in 12%, 16% and 18% saccharose solution in Phosphate buffer (PB, 0.1M). Brains were then frozen in Isopentane at -40°C during 3 min, and stored at -20°C until sectioning. Coronal sections (40 µm thick) were cut using a cryostat (Thermo Scientific Microm HM 560) at -18°C ± 2°C. Each section was individually placed in a well of a 48 multiwell plate containing AMARAL solution (Glycerol, Ethylen Glycol, Distilled water, PB 0.1M) at 4°C until treatment. Each section containing the BLA was placed on a microscope glass slide, floating in PBS (0.1M), in order to

observe tissue quality, coordinates, and EGFP expression by epifluorescence microscopy (Olympus BX60 with x4 objective, Explora Nova Software). Rats for which the BLA presented no EGFP fluorescence (no vector transduction), holes caused by injection, or having main EGFP signal outside the BLA due to misplaced injection, were excluded from the entire experiment. At the end, a total of nineteen rats injected at PN50 and ten rats injected at PN25 were excluded from the results, whatever their viral condition. In sum, twenty-five animals injected at PN50 (Vir_ctrl or Vir1_Tsc2) and thirty-five animals injected at PN25 (Vir_ctrl, Vir1_Tsc2 or Vir2_Tsc2) were conserved for behavioral and histological analyses.

Detection of EGFP and Tsc2 by Immunofluorescence studies

Protocol: Fourty sections from PN25_inj rats correctly injected with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 were chosen depending on the highest immunostaining quality and presenting the denser viral diffusion specifically into the BLA (8 amygdalae from 5 Vir_ctrl rats; and 6 amygdalae from 5 Vir1_Tsc2 rats) were washed 3 x 10 min in PBS 0.1 M, then once in PBS 0.1 M/Triton 0.5%, and washed again in PBS 0.1 M (3 x 10 min). Then, slices were incubated individually in 250 µl of a blocking solution containing 1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma Aldrich, A9647-50G), 5% Normal Goat Serum (NGS, Eurobio, CAECHV00-0U) and 0.1% Triton in PBS 0.1M, for 1h at RT. Sections were then co-incubated with the primary antibodies against EGFP (Chicken anti-GFP, 1:1000 dilution, Ab13970) and against TSC2 (Rabbit anti-Tuberin– N terminal, 1:100 dilution, Abcam, ab189304) diluted in the blocking solution for 24h at 4°C on a rotor plate. The following day, sections were washed in PBS 0.1 M (3 x 10 min), co-incubated in 300 µl of a mix of secondary antibodies, i.e., a Goat anti-chicken Alexa Fluor 488 (1:400, Thermofisher A11039) and a Goat anti-rabbit Alexa Fluor 546 (1:400, Thermofisher A11035) diluted in a blocking solution (BSA 2%, NGS 2% in PBS 0.1M), during 45 min on a rotor plate at RT, covered by aluminum foil to protect fluorophores from light. Sections were then washed in PBS 0.1 M (3 x 10 min) and mounted on Trajan glass slides (Series 3 Adhesives, Trajan, T7611), embedded with Fluoromount® Aqueous Mounting Medium (Sigma Aldrich, F4680) and stored at 4°C protected from light.

Analysis: The intensity of both Tsc2 (red) and EGFP (green) IR was measured in BLA cells using the ImageJ software (ImageJ 1.53c, Wayne Rasband, NIH, USA). Images were acquired using a Zeiss confocal microscope (Zeiss LSM700) using x20 objective. The fluorescence intensity of each fluorescent cell into the BLA were thus measured in the red and/or green channel. To individualize every cell in each channel, a duplicate layer of either the Tsc2 (red) or EGFP (green) fluorescent image was used, each converted into binary 8-bit (grey); the background was subtracted with a threshold adjusting algorithm, and an automatic contour of each Tsc2(+) and/or EGFP(+) cell was drawn and analyzed with the “Analyze Particle” function

of ImageJ. For each channel, each particle (cell) was labeled with a unique number and was added to the ROI manager.

The mean grey intensity of each cell was calculated from 8-bit grey images using the “Analyze/Measure” function in ImageJ. To determine which Tsc2 (+) cell was also EGFP(+), reflecting colocalization of the two markers in transduced neurons, the initial EGFP image was taken, and the ROI manager corresponding to the Tsc2 (red) channel was superimposed on the EGFP (green) image. Every particle drawn that perfectly overlaid with an EGFP(+) cell was counted as a Tsc2(+)-EGFP(+) colocalization.

2.6 Detection of c-FOS(+) cells by immunohistochemistry

Protocol: Three EGFP(+) BLA sections were taken from each rat injected with Vir1_Tsc2 or Vir_ctrl. In addition, three tissue sections from the prefrontal cortex were chosen depending on their anteroposterior (AP) coordinates (for Methods, see (Jacques et al. 2018)) from AP 2.8 to AP 2.6 mm relative to Bregma in order to maximize the mPFC cellular activity analysis through the antero-posteriority axis. Briefly, sections containing prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortices at 3 different AP were chosen based on the shape and length of the *corpus callosum*, measured as the Ferret Length (Jacques et al. 2018). For each AP, the Ferret length had to be statistically not different between subjects and between experimental conditions, but it had to be statistically different between APs. Sorting the sections with this method allowed us to measure specifically differences in c-FOS(+) cells density at a given AP and for a specific microanatomical zone. Sections of the three structures (BLA, PL and IL) were treated for immunohistochemistry (IHC) at the same time, ran in 3 series (most anterior, middle and posterior slices).

Sections stored in AMARAL at 4°C were washed in PBS 0.1M (3 x 10 min) at RT using a rotor plate, then incubated 10 min in a mix of 20% Methanol, 77% distilled water (dH₂O) and 3% H₂O₂ in order to deactivate endogenous peroxidases. Sections were then washed in dH₂O, then in PBS 0.1M for 5 min and finally in PBS 0.1M with 0.2% Triton once for 10 min. Each section was then incubated in 1.5 ml of a blocking solution containing PBS 0.1M, 0.2% Triton and 5% NGS (Normal Goat Serum, Eurobio, CAECHV00-0U) for 1h at RT using a rotor plate. Finally, sections were individually incubated for 48h on a rotor plate at 4°C in 1.5 ml of a primary antibody against c-FOS (Rabbit anti-c-FOS, 1:3000, Proteintech, Euromedex, ref: PR-26192-1-AP) diluted in the blocking solution. Sections were then successively washed in PBS 0.1M-Triton 0.2% (3 times 10 min each), incubated individually in 1.5 ml of goat anti-rabbit IgG (H+L) biotinylated secondary antibody (1:400, Eurobio, BA-1000) in blocking solution for 90 min at RT using a rotor plate, washed in PBS 0.1M-Triton 0.2% for 10 min, incubated 90 min in the ABC kit (Kit Vectastain Elite ABC HRPO, Vector Lab, dilution 1:800) prepared 30 min before,

and washed again in PBS 0.1M-Triton 0.2% for 10 min. Immunohistochemistry revelation was finally performed using a Vector SG Peroxidase Substrate Kit (Substrat SG HRP, Eurobio, SK-4700). Sections of mPFC and BLA were individually incubated in 1.5 ml of the Substrate kit solution, and the revelation was stopped at desired coloration (about 4 min for mPFC and 8 min for BLA). Reaction was stopped by transferring slices in dH₂O and storing them in PB 0.1M at 4°C for 24h. Sections were then mounted on Trajan glass slides, dehydrated in acetone (2 x 5 min), immersed in xylene (2 x 5 min), immediately embedded with Eukitt (Chem Lab, Belgium, ref CL0405030500) and stored at 4°C protected from light.

Analysis:

Image preparation for quantification of c-FOS(+) cells: Histology images were taken with an Olympus optic microscope using a x4 objective. We excluded from analysis the sections presenting unreliable staining (heterogeneous staining in the structures due to folding of the tissue during process), no staining or damaged tissue. (BLA : Vir_ctrl : PN50; $n = 13$; PN25 $n = 10$; Vir1_Tsc2 PN50; $n = 12$; PN25; $n = 10$). For the mPFC, sections with extreme AP coordinates were excluded, and only PL and IL staining at AP 2.7 and 2.6 were common to most of the stained slices among animals. (AP 2.6: Vir_ctrl; PN50, $n = 8$; PN25, $n = 11$; Vir1_Tsc2; PN50, $n = 8$; PN25; $n = 13$; AP 2.7: Vir_ctrl; PN50, $n = 8$; PN25, $n = 10$; Vir1_Tsc2; PN50, $n = 8$; PN25; $n = 16$). Two control sections, one from mPFC and one from BLA, incubated in the blocking solution without primary antibody did not show any specific or confounding unspecific background staining.

Images were acquired using an optic microscope (Olympus BX 60) at x10 objective in a vertical mosaic manner, forming a vertical grid of 2x4 images for mPFC and with a square 2x2 design for BLA. Individual images were stitched using the Grid/Collection Stitching plugin in Fiji (Fiji software,(Schindelin et al. 2009); Grid/collection stitching plugin, (Preibisch et al. 2009) to form a single image. The image scale was set, and the contours of PL, IL and BLA were done manually in Fiji, using anatomical landmarks to determine the sizes and edges of the target structures. Typical landmarks in mPFC were the sizes and shapes of the caudate putamen and corpus callosum. For BLA, the lateral ventricle size, external capsule fiber aspect or optical fiber size were relevant anatomical anchors to isolate proper structure contours (for further methods, see (Bergstrom et al. 2011; Jacques et al. 2018); (Paxinos et Watson, 2009).

Cell counting in mPFC and BLA: Areas of each outlined structure were measured and c-FOS(+) cells present in this area were manually counted using the “multi point” tool in Fiji. Non-

colored cells (grey intensity equal to background), particles with non-neuronal shape, and particles under 4 μ m of diameter were excluded from counting.

Density heat map analysis of mPFC: Methods to create density heat map have previously been detailed in (Jacques et al. 2018). We followed this method with slight modifications as we used Fiji software to calibrate the counting areas, draw the structures contours and manually count c-FOS-positive cells. The density heat maps were created using a MATLAB script written by the experimenter (MathWork Simulink, Matlab 2019a, USA). Briefly, once all the c-FOS(+) neurons were counted in the calibrated and contoured counting area, their (x,y) coordinates were then binned and transformed into matrices to measure the exact localization and density of c-FOS(+) cells. As previously shown (Jacques et al. 2018), the number of bins can be calculated based on experimenter parameters or using existing formulas. Here, we calculated bins density with the square root of the total number of cells in each condition (\sqrt{n}). In order to compare conditions (CTRL/VIR) and groups (PN25/PN50) at the same matrix resolution, we transformed every (x,y) data into matrices containing the same number of bins, corresponding to the number of bins calculated for the viral condition presenting the highest density of c-FOS(+) cells, thus providing the optimal matrices resolution. Once the final number of bins was defined, (x,y) coordinates of each structure were transformed into two matrices (30x30 for PL and 20x20 for IL), mirrored for both hemispheres, and averaged by conditions (CTRL vs VIRUS), using MATLAB. Averaged matrices were then transformed into a binned color map, smoothed and scaled at the same density units to form a final density heat map.

2.7 Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Parametric tests were used for most parameter analyses addressing interactions between several factors and repeated measures (ANOVAs with repeated measures (RM)). Parametric comparisons (paired and two-group comparison unpaired t-test), Helmert contrasts tests, mixed ANOVA with group (age and viral condition) as independent (between) factors and repeated measures (Two- and Three-Way ANOVAs) as dependent (within) factors, followed by Holm post-hoc test, were performed using JASP (JASP Team (2020), version 0.13.1) and JAMOVI (The JAMOVI project (2020), version 1.2). The Two-Way ANOVAs and FDR (False Discovery Rate) analyses for the matrices were done using GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA). Principal component analysis was performed using Statview 5.0 software (SPSS, USA). Factor extraction was performed using an orthogonal rotation (Varimax) and the weight of each variable on each extracted factor was calculated. Linear regression was performed using XLSTAT software. For all analyses, the *alpha* level of significance was set at 0.05, except for FDR analysis which was set at 0.1.

3. Results

3.1 Lentiviral transduction efficiency

Before their use in behavioral experiments, the transduction efficacy and cellular activity of the two viral vectors targeting distinct sequences of Tsc2 (“active” vectors) were analyzed and compared to a control vector (Vir_ctrl). Efficiency was first evaluated following transduction of primary cortical and hippocampal neurons *in vitro* (**Figure 2.1**). The qRT-PCR analyses from transduced primary cortical neurons with either Vir1_Tsc2 or Vir2_Tsc2 revealed decreases of Tsc2 mRNA expression around 52% and 40% following transduction with Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2, respectively (**Figure 2.1a**). All lentiviral vectors (control or active) expressed EGFP under the control of a synapsin promoter, allowing identification of transduced neurons (**Figure 2.1b**, but also **Supplementary Figure 2.1** for outline of the lentiviral strategy). Primary hippocampal neurons transduced by the two active vectors had a significant decrease of Tsc2 protein expression levels (~20%) compared to cells transduced by the control vector (**Figure 2.1c**; Viral condition effect: $F(2,197) = 13.2$, $p < 0.001$). Holm *post hoc* test revealed that the Tsc2 decrease was specific to cells transduced with the active vectors (Vir_ctrl vs Vir1_Tsc2 $p < 0.001$; Vir_ctrl vs Vir2_Tsc2 $p < 0.001$). The results demonstrated that all three lentiviral vectors efficiently transduced primary cortical and hippocampal neurons, and the two active viruses significantly diminished expression levels of Tsc2 mRNAs, thus, successfully reduced the protein levels in the transduced cells *in vitro*.

Viral transduction efficacy was also investigated *ex vivo* using immunofluorescence analyses in brain tissue sections obtained from rats that received, 14 weeks before, injections of the different vectors into the basolateral amygdala (BLA) by stereotaxic methods (**Figure 2.2a**). Efficiency of Tsc2-KD was quantified by analyzing a sample of BLAs injected with either Vir_ctrl or Vir1_Tsc2. Dual-labelling of EGFP and Tsc2 showed that in the BLA cells transduced with the active vector Vir1_Tsc2 (Tsc2(+)/EGFP(+)), there was a significant decrease (~15%) of Tsc2 mean fluorescence intensity compared to cells transduced with the control (inactive) vector (Vir_ctrl) (**Figure 2.2b**; $t(12) = 2.30$; $p = 0.044$). There was also a significant decrease in Tsc2 IR in Tsc2(+)/EGFP(+) transduced cells compared to non-transduced Tsc2(+)/EGFP(-) cells in the same BLA (paired sample t-test Tsc2(+)/EGFP(+) vs Tsc2(+)/EGFP(-); $t(5) = -7.07$; $p < 0.001$), confirming that the active lentivirus vector was responsible for the decrease in Tsc2 expression. There was no global difference in EGFP IR, nor in background mean intensity between the two sets of BLAs, reflecting a similar transduction rate between viral conditions (**Supplementary Figure 2.2a**). This analysis validated the knock-down (KD) effect of the virus on Tsc2 protein expression in BLA *in vivo*.

Observation of lentiviral EGFP immunoreactivity (IR) confirmed that all lentiviral vectors (Vir_ctrl, Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2) had the potential to transduce BLA cells *in vivo* (**Figure 2a, Supplementary Figure 2.2b**) with a main EGFP localization into the basolateral amygdala (**Supplementary Figure 2.2c-d**) for animals injected at PN25 or PN50 with the control or active viruses. The EGFP-positive cells seen in the lateral amygdala were mainly due to the cannulae track during lentiviral infusion (**Figure 2a, Supplementary Figure 2.2b**).

3.2 Behavioral outcomes of Tsc2 partial inhibition in basolateral amygdala

Behavioral testing was undertaken in PN25_injected and PN50_injected rats once they all had reached adulthood. The effects of the active viruses were evaluated by comparing behavior with rats injected with the control virus, in tests depending on the integrity of the networks involving the amygdala and the prefrontal cortex (i.e., fear conditioning and fear extinction paradigms).

Fear conditioning and extinction protocols took place successively across five consecutive days from habituation at Day 1 to renewal and generalization testing at Day 5, in two different contexts (**Figure 2.3a**). Habituation (Day 1) consisted of the presentation of five to-be-conditioned tone stimulus alone in context A, and was intended to assess and reduce unconditioned fear to the context or to the tone alone. Fear learning also took place in context A and consisted of 7 tone-shock (CS-US) trials, during which a rapid increase of the percent freezing to the CS with successive CS-US presentations reflects successful fear learning. During Day 3, 20 CS alone were presented in a new unknown context (Context B) to assess context generalization, long-term fear memory specifically to the CS, and its extinction due to unreinforced repetition of CS presentation. Day 4 tested the memory of extinction, with 5 presentations of the CS alone in context B. Finally, Day 5 was comprised of the renewal test followed by fear generalization testing to an unknown tone. Renewal testing consisted of five presentations of CS alone in the initial training context (Context A), in order to determine the level of fear when returning to the initial learning context. Fear generalization was then tested in that same context with five presentations of a new – unknown - tone stimulus (at a distinct frequency). A higher fear to an unknown, non-conditioned stimulus reflects an overgeneralization of cued-fear. The data were analyzed using a Three-Way Repeated Measures (RM) ANOVA analysis comparing freezing behavior during each trial or each context Day (within-subject factor) and 2 x 2 between-subject factors: the age of viral injection (PN25 and PN50) and the viral condition (ctrl and active). Thus, the following analyses are based on a (nTrial or Context Day) x Viral Condition x Age of injection design.

Freezing to context, measured before the first tone of each session, showed no difference between viral conditions, nor between ages at which the vector was injected, at any of the five days (**Supplementary Figure 2.3a, Supplementary Table 2.1a**). Planned comparisons showed no differential generalization of fear to the new context B during the first session of extinction (Day 2 vs Day 3), but a differential renewal of fear (Day 4 vs Day 5) between ages of injection (PN25 and PN50), when animals were returned back to the initial training context A (**Supplementary Table 2.1a**, Day x Age interaction; $p = 0.048$). Animals injected with the active virus, whatever the age of injection, globally showed a lower percentage of freezing at the two testing days (Day 4 and 5) compared to animals injected with the control virus (Viral condition effect; $p = 0.043$). Holm *post hoc* analyses revealed that PN25_injected rats, but not PN50_injected rats, showed an increase in freezing between Day 4 and Day 5 (PN25_inj: $p < 0.001$; PN50_inj: $p = 0.217$). These results suggest a tendency for PN25_inj rats, regardless of the virus condition (inactive and active virus), to extinguish faster their generalization to context B and/or renew more strongly their fear to the conditioning context. This may reflect an impact of the surgical procedure and/or the anesthesia on a developing brain (i.e., PN25_inj rats) that could influence fear behavior at adult age.

Freezing levels specific to the tone CS were different depending on the age at which the active virus was injected during distinct phases of the protocol (**Figure 2.3b, Supplementary Table 2.1b** for detailed statistical analyses). During habituation (Day 1), there were no differences between viral conditions or age of injection in the percent freezing to the CS, suggesting comparable unconditioned reaction between groups. During fear learning (Day 2), there was a rapid increase in the percent freezing to the CS across repetitions of CS-US pairings, with a significant Trial x Age interaction ($F(6,276) = 2.825$; $p = 0.011$). *Post hoc* analysis only pointed to slightly different kinetic curves depending on the ages of injection without revealing differences between groups at any trial, reflecting successful fear learning for all viral conditions or age of injection. Thus, fear learning was largely unaffected by age of infusion and/or Tsc2 inhibition. Long-term fear memory, assessed through the analysis of the first five CS in a new context the next day (Day 3, trials 1-5), differed depending on the age of injection, with PN25_injected rats showing a lower level of freezing compared to PN50_injected rats (Age effect; ($F(1,46) = 6.289$; $p = 0.016$; PN50_inj, Mean: 88.243 ± 2.88 %; PN25_inj, 80.476 ± 3.36 %). The level of fear extinction, as assessed through the analysis of the last five CS on the day (Day 3, trials 16-20), revealed an effect of the Viral Condition ($F(1,46) = 4.222$; $p = 0.046$; Vir_ctrl: 44.84 ± 5.47 %; Vir1_Tsc2: 58.92 ± 5.99 %), with no effect of age of lentiviral injection. These results indicate that rats with Tsc2-KD in BLA showed a delayed extinction learning, whether rats were injected during adolescence or adulthood. However, when the long-term memory of extinction was assessed 24h later (Day 4, extinction

recall), no differences between ages or viral conditions were detected, but only further extinction (Trial effect, $F(4,184) = 16.338$; $p < 0.001$). This was also true during the renewal test in the original context on Day 5, during which only a global Trial effect was observed ($F(4,184) = 27.994$; $p < 0.001$), but no significant main group effect and no significant group x trial interaction, indicating that the animals did not differ in their CS-associated memory whatever the context they were tested in.

In contrast, when fear generalization was assessed by presenting a new unknown tone, a differential level of fear was observed depending on the viral condition and age of injection (**Figure 2.3b**, Day 5 Trials 1' to 5'; Age x Viral Condition interaction, $F(1,46) = 7.25$; $p = 0.010$), due to an apparent lack of extinction during this part of the test selectively in rats injected at PN25 with active Vir1_Tsc2 vector. Holm *post hoc* analysis confirmed this by revealing a significant difference between Vir_ctrl and Vir1_Tsc2 conditions in PN25_injected rats (Vir_ctrl PN25_inj, Mean: 37.850 ± 6.04 %; Vir1_Tsc2 PN25_inj, Mean: 64.798 ± 6.28 %; $p < 0.001$), but not in PN50_injected rats, suggesting that only PN25_injected rats with Vir1_Tsc2 showed an overgeneralization of fear to a new tone.

In order to consolidate our conclusion that the knock-down of Tsc2 in BLA was responsible for alterations of fear behavior and discard a putative off-target effect of the virus, we also tested in parallel the impact of the second active lentivirus, Vir2_Tsc2 when injected in BLA of PN25 rats, by assessing fear conditioning, extinction and generalization following the same protocol as in **Figure 2.3a**. The results of this important control experiment are shown in **Supplementary Figure 2.3b-c**. For each phase of the protocol, a Helmert contrast test was used to compare Vir_ctrl vs [Vir1_Tsc2, Vir2_Tsc2] on one hand, and Vir1_Tsc2 vs Vir2_Tsc2 on the other hand (See **Supplementary Table 2.2** for statistical details). Freezing to the context showed no differences between viral conditions except in context B at the beginning of extinction recall session (Day 4), where PN25_injected rats with Vir2_Tsc2 showed a significantly higher level of fear than animals injected with Vir1_Tsc2 (**Supplementary Figure 2.3b**; **Supplementary Table 2.2a**; Helmert Contrast Test $t(32) = - 2.493$; $p = 0.018$). This higher level of fear could reflect an overgeneralization of fear to the safe context, where the CS presentation alone during extinction in the new context transferred an aversive state to this context.

Freezing levels to the CS showed that the effects of Vir2_Tsc2 were similar to Vir1_Tsc2 (see **Supplementary Figure 2.3c** and **Supplementary Table 2.2b** for detailed statistical results), except for one case during habituation (Day 1). On that day, there was no significant difference between the two active viral conditions and the control virus, but Vir1_Tsc2 injected animals showed a higher level of freezing to the unconditioned tone compared to Vir2_Tsc2

(Helmert contrast test; $p = 0.008$). Importantly, however, the analysis of level of freezing during the last five trials of extinction on Day 3 confirmed that PN25 rats injected with an active virus, Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2, showed a higher level of freezing compared to animals injected with the control virus, indicating that both active viral conditions were associated with a delayed fear extinction (Helmert Contrast test, Vir_ctrl vs [Vir1_Tsc2, Vir2_Tsc2], $t(32) = -2.539$; $p = 0.016$), with no significant difference between Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2-injected animals. Analysis of generalization to a new tone on Day 5 (Tones 1'-5') indicated also no difference between Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2, and a significant difference between these two groups of animals and the Vir_ctrl group ($t(32) = -4.587$; $p < 0.001$), confirming that rats injected with Vir1_Tsc2 or Vir2_Tsc2 into the BLA during adolescence overgeneralized their fear to the new tone at the adult age.

Thus, Vir2_Tsc2 injections in PN25 rats' BLA mostly altered fear behavior in the same way as Vir1_Tsc2 injected animals at PN25, as reflected by delayed fear extinction and overgeneralization of fear to a new tone. This indicates that these behavioral outcomes were not due to unspecific off-target effects and validates our model of Tsc2 knock down during brain development. Together, the behavioral results showed that a partial knockdown (KD) of Tsc2 into the BLA during brain development had a greater impact on behaviors involving the fear circuit compared to a KD of Tsc2 set out in a mature brain. Indeed, whereas both groups of age showed a delay in extinction learning, only rats injected with Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2 at PN25 showed overgeneralization of fear to an unknown tone in the initial learning context.

3.3 Basal neural activity changes following Tsc2 partial inhibition in basolateral amygdala

Knowing the functional role of the BLA – medial Prefrontal Cortex (mPFC) pathway in fear acquisition and extinction, the behavioral outcomes unveiled in this study are congruent with a potential impact of BLA modification on a still maturing mPFC, with a stronger impact when KD was induced from adolescence (PN25). Brains were taken for immunohistochemistry (IHC) 7 weeks after the fear conditioning protocol, from rats injected with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2, and BLA and mPFC were analyzed for c-FOS(+) cells as reflecting basal level of neural activity (**Figure 2.4a-b**). For these analyses, we considered each hemisphere independently, given the bilateralism of injection (Cassell and Wright 1986).

Density of c-FOS(+) cells in BLA and prefrontal cortex

There was no difference in c-FOS(+) cell density in the BLA between viral conditions near the site of injection (**Figure 2.4c**, Viral condition, $F(1,36) = 0.201$; $p = 0.656$), but a significant age effect was observed with a highest number of c-FOS(+) cells in PN25_injected animals (Age effect, $F(1,36) = 20.273$; $p < 0.001$). Regarding a potential concern given the epileptogenic status in TSC patients, it seems that the Tsc2 disruption in BLA cells did not induce epileptogenic status, as seen by the unchanged c-FOS activity in BLAs. Thus, BLA basal activity was unchanged at long-term, probably due to the partial, rather than complete, knock-down of Tsc2 and its locally restricted anatomical diffusion.

In contrast, specific changes were detected in the prefrontal cortex. Injection at PN25 resulted in a higher density of c-FOS(+) cells in the prelimbic cortex (PL) as compared to the PN50_injected group, associated with a higher density of c-FOS(+) cells for animals injected with the active virus compared to animals injected with the control virus. (**Figure 2.4d**, Two-Way ANOVA; Age effect $F(1,39) = 40.07$; $p < 0.001$; Viral condition effect $F(1,39) = 40.49$; $p = 0.002$) and a marginally significant Viral condition x Age interaction ($F(1,39) = 3.48$; $p = 0.07$). The same tendency was observed for the infralimbic cortex (IL), but the viral condition effect did not reach significance (Age effect $F(1,39) = 22.20$; $p < 0.001$; Viral condition $F(1,39) = 2.11$; $p = 0.154$).

These results suggested a potential differential effect of Tsc2 KD into BLA between animals injected at adolescence and those injected at adulthood. This could possibly impact BLA-mPFC functionality and mPFC basal activity, resulting in a higher PL and/or IL activity in adult animals injected during adolescence. Knowing that the trajectories of BLA-mPFC and

PL-IL projections develop in a laminar-dependent manner, we further investigated the distribution of the increased c-FOS activity within the prefrontal cortex.

Spatial distribution of c-FOS(+) cells in PL and IL cortices

To analyze the spatial distribution of basal cell activity, we created a density heat map representing the proportion of c-FOS(+) cells in either PL or IL cortices at two anteroposterior (AP) levels: AP 2.6 and AP 2.7 mm from Bregma. This was analyzed for both PN25 and PN50_injected groups to compare the two viral conditions (Vir_ctrl and Vir1_Tsc2).

The heat map constructed at AP 2.6 from PN25_injected rats evidenced changes in c-FOS(+) cells density between the active and inactive viral conditions which depended on the XY coordinates within the Prelimbic cortex (**Figure 2.5a**; Two-Way RM ANOVA, Viral Condition x Coordinates interaction, $F(829,18260) = 1.375$; $p < 0.0001$). *Post hoc* False Discovery Rate (FDR) analysis detected significant differences between the XY coordinates matrices for 29 out of 830 tested bins (**Figure 2.5a**; q-values comprised between $q < 0.0001$ and $q = 0.00868$). This reflected that Vir1_Tsc2 injected animals had a higher c-FOS(+) cell density selectively in bins located in the deepest and middle layers of the PL structure.

Interestingly, for the infralimbic cortex as well, the same analysis revealed a differential c-FOS(+) cell density between viral conditions depending on the XY Coordinates (**Figure 2.5b**; Two Way RM ANOVA, Viral Condition x Coordinates interaction, $F(399,8778) = 1.191$; $p = 0.0062$). However, FDR analysis did not reveal differences at any bin among the 400 tested bins. As observed in the heat map, rats injected with Vir1_Tsc2 showed a global higher density in infralimbic cortex compared to Vir_ctrl animals.

The analysis at AP 2.7 confirmed a significant difference for PL between viral conditions depending on the XY Coordinates in PN25_injected rats (**Supplementary Table 2.3**, $p < 0.0001$), although *post hoc* FDR found only 2 significant bins among the 829 bins tested (**Supplementary Figure 2.4a**). Finally, differential results were obtained from infralimbic cortex at AP 2.7 (**Supplementary Figure 2.4b**) compared to AP 2.6, as we found no differences in c-FOS(+) cells density depending on the XY coordinates, no global viral condition effect, but only a significant XY coordinate effect (**Supplementary Table 2.3**, $p < 0.0001$; 400 bins tested).

In PN50_injected animals, TCS2-KD did not result in differences in c-FOS(+) cell density within PL cortex at AP 2.6 (**Figure 2.6a**, 852 bins tested), nor at AP 2.7 (**Supplementary Figure 2.5a**, 865 bins tested, **Supplementary Table 2.3**). Similar results were obtained concerning the IL cortex, where PN50_injected Tsc2-KD group did not differ

from the control group at both AP 2.6 (**Figure 2.6b**, 396 bins tested) and AP 2.7 (**Supplementary Figure 2.5b**, 394 bins tested) (**Supplementary Table 2.3**). This analysis revealed that Tsc2 KD into BLA of PN50_injected animals did not alter basal neuronal cell activity at long-term in prelimbic or infralimbic cortex.

In sum, this topographical analysis of c-FOS(+) cell density in PL or IL cortices unveiled that the spatial distribution of the effects of the vectors depended on the age at which the virus had been injected. To analyze whether the differences observed were specific to certain cortical layers, we next sorted the total number of c-FOS(+) cells depending on their layers of origin in PL or IL cortices. This analysis revealed a significant increase in the number of cells in specific layers in the rats injected in the BLA with Vir1_Tsc2 lentivirus at PN25 (**Figure 2.7a**; PL cortex AP 2.6: Two-Way RM ANOVA; Viral Condition x Layer interaction, $F(2,44) = 7.729$; $p = 0.001$, **Supplementary Table 2.4**). Holm *post hoc* analysis showed a significant increase in the number of cells in Vir1_Tsc2 injected animals compared with Vir_ctrl injected animals, in middle layers (II III, $p < 0.001$) and deep layers (V VI, $p < 0.001$). Similar results were obtained concerning PL cortex at AP 2.7 (Viral Condition x Layer interaction, $F(2,48) = 4.147$; $p = 0.022$). Holm *post hoc* analysis pointed to a significant difference between viral conditions in deep layers V VI ($p = 0.037$), and an increase in the number of cells in layers V VI compared to layers II III in Vir1_Tsc2 condition ($p < 0.001$). This was not found in rats injected with the inactive control vector. Interestingly, a significant difference between viral conditions was also found in the infralimbic cortex at AP 2.6, which also depended on the layer (**Figure 2.7b**; Viral Condition x Layer interaction, $F(2,44) = 5.395$; $p = 0.008$): Indeed there was a significant increase in the number of cells in the “Vir” viral condition compared to Vir_ctrl in layers II III ($p = 0.008$). Moreover, cell density was significantly higher within layers II III compared to layers V VI in rats injected with the active vector ($p < 0.001$), which was not observed for the Vir_ctrl condition ($p = 0.527$). When the same analysis was performed for PN50_injected animals, no differences were found between viral conditions, whatever the brain area (**Supplementary Figure 2.6a, b**; **Supplementary Table 2.4**).

Animals injected with the active virus at adolescence showed an increased basal activity at long-term in specific layers in the prefrontal cortex and PTSD-like behaviors when subjected to fear conditioning at adulthood, raising a potential relationship between the two. In order to further determine possible correlations, we ran a principal component analysis (PCA) test including six quantitative variables (c-FOS counting in middle and deep layers of PL and IL at AP 2.6, and percent freezing at the end of extinction session and during the generalization test) followed by multiple correlation testing. The resulting PCA analysis extracted two principal components (factor 1 and 2) contributing to 78.39% of the variance (**Supplementary Figure**

7a), which comprised the number of c-FOS(+) cells in PL cortex and percent of freezing to tones 1'-5' at generalization testing for the Factor 1, and the number of c-FOS(+) cells in IL cortex for the Factor 2 (**Supplementary Figure 2.7a-b**). Bartlett's sphericity test revealed that variables in the two components respected homogeneity of variances ($\chi^2 = (20) = 64.031$; $p < 0.0001$).

The associated correlation matrix pointed to a logical high correlation between number of c-FOS(+) cells in middle and deep layers for both PL ($R^2 = 0.645$; $p = 0.001$), and IL ($R^2 = 0.742$; $p = 0.0002$) cortices (**Supplementary Figure 2.7c**), reflecting an anatomical and functional relationship in cell activity between these two cortical layers in each structure. Interestingly, the freezing level during the generalization test correlated significantly with the number of cFOS(+) cells in layer II III of PL cortex ($R^2 = 0.37$; $p = 0.027$), suggesting that the specific increased generalization observed for PN25_inj animals could have been related to an elevated basal cellular activity in middle layers of PL cortex (**Supplementary Figure 2.7c**).

4. Discussion

What predisposes to the emergence of PTSD when trauma is experienced during adulthood is still unknown, and early life insults in combination with genetic factors are likely to play a role (Chaby et al. 2020; Henigsberg et al. 2019; Rumball et al. 2020). Among potential sources is a dysfunctional amygdala-prefrontal (AP) network, a network still undergoing massive maturation until late adolescence under the control of the early functional amygdala, a detector/regulator of adverse events (Gee et al. 2013; Hwang et al. 2014; Tottenham and Gabard-Durnam 2017; VanTieghem and Tottenham 2018). Using a lentiviral methodology in rats, we show here that a knock-down of the Tsc2 mRNA in the BLA at early adolescence (PN25) modifies adult neural activity in specific layers of the mPFC (as measured by c-FOS expression) and promotes PTSD-like behaviors following an auditory fear conditioning at adult age, with resistance to extinction and overgeneralization to a new sound.

The lentiviral methodology was chosen to spatially circumscribe the incorporation and action of the miRNA as much as possible to the BLA. The active virus was under a CaMKII promoter, aiming at targeting the 80% excitatory pyramidal cells of BLA, which highly express CaMKII (McDonald 1984; Ouimet et al. 1984). Our analyses indicate a transduction efficiency *in vivo* of approximately 15-20%, as evaluated through EGFP/Tsc2 protein levels that was mainly affecting the BLA, and sometimes also the LA due to cannulae track, showing an effective transduction in our zone of interest and restricted impact to the adjacent zones. As not all of the amygdala cells were transduced by the active lentiviruses, it is likely that this localized and BLA-restricted transfection rate has lowered the risk for amygdala-generated general epilepsy, as no change in cFOS(+) cells was observed near the site of injection in BLA, and no overt sign for major epilepsy was ever observed in any of the animals in their home cage nor at any stage of the visually-monitored behavioral experiments. Knowing the roles of Tsc2 in the regulation of the mTOR pathway (Li et al. 2004), an alteration of this signaling pathway essential for brain development and regulating cellular growth and proliferation, dendritic arborization, autophagy, protein translation and excitatory and inhibitory drives (Hoeffler and Klann 2010) could have promoted a higher metabolic status into BLA pyramidal cells, as well as morphological alterations similar to those seen in fear-related disorders (Shin and Handwerker 2009; Vyas et al. 2004; Vyas et al. 2002). Although BLA pyramidal cells reach their adult-like size before PN25, their dendritic arborization is still developing through adolescence (Shapiro et al. 2017), and thus morphological changes of BLA could have been favored by a Tsc2-KD in adolescent-injected animals. We did not observe obvious morphological differences in transduced-cells soma areas in immunofluorescence analyses

(not shown), as evaluated concomitantly by Tsc2 / EGFP detection and cell contouring, nor in BLA area and volume (not shown). Their basal level of neural activity, as assessed by quantification of c-FOS protein expression later in adulthood, was not modified. The sole difference observed was age-related, and not virus-related, with an increased level of neural activity in animals injected during adolescence, as compared to those injected as young adults, which could possibly be related to an age-dependent differential impact of anesthesia/surgery (e.g., Ju et al. 2020). It remains possible that Tsc2-KD also altered signaling pathways independently from c-FOS synthesis pathways, occulting a differential cell activity existing in transduced cells. Whether finer modifications in arborization and/or synaptic contacts were induced, as well as whether compensatory mechanisms have been at play to keep BLA micro-networks activity at a homeostatic level, will need further investigation.

More importantly with regard to our initial aim, changes were observed in basal neural activity in mPFC, specifically in animals injected with the Tsc2-KD virus in the BLA at adolescence. None of these changes were observed in animals injected when they were young adults. Thus, although the animals were not naïve when perfused, it seems unlikely that these changes were related to the training, as all brains were taken directly from the colony room, at least 7 weeks after the last session, and no similar changes were observed in BLA. The increased c-FOS(+) cells were seen in all, excepted superficial layers of PL cortex, and in the middle layers of IL cortex. The middle (II/III) and deep (V/VI) layers are known to be directly interconnected with limbic structures, in particular with the basolateral amygdala, with the development of BLA to mPFC connectivity preceding reciprocal projections (Arruda-Carvalho et al. 2017; Bouwmeester et al., 2002; Bouwmeester et al., 1996). At PN25, the connectivity between amygdala and prefrontal cortex is still in development, marked by a dense sprouting of projections emerging from the posterior BLA to layer V of PL and IL cortex (Cunningham et al., 2002), specifically in an axodendritic manner promoting direct excitatory drive from BLA that could modulate mPFC activity by targeting glutamatergic or GABAergic cells located in these layers. Reciprocally, the mPFC during adolescence is marked by the development of projections from deep layers to BLA, mainly to its anterior part, that are significantly pruned from late adolescence to adulthood (PN45 – PN90) (Arruda-Carvalho et al. 2017; Cressman et al. 2010a,b). Knowing that bidirectional cortico-cortical connections between PL and IL cortices are made through deep (V/VI) and in a lesser extend middle (II/III) layers (Roger Marek, Xu, et al. 2018; Mukherjee and Caroni 2018), and that projections from IL to BLA originate from layer II/III and V (Ferreira et al. 2015), the increase in c-FOS(+) cells' density in layer II/III of IL cortex, but not in the deepest layers, suggests a dysregulation of activity between PL and IL cortices. Indeed, during that developmental stage, connectivity within the prefrontal cortex is also under construction/refinement (Chini and Hanganu-Opatz 2020; van

Eden and Uylings 1985; Kolb et al. 2012), and an imbalance between excitatory and inhibitory drives may have also been at play (Caballero et al. 2014; Konstantoudaki et al. 2018). Thus, Tsc2-KD in the posterior BLA at the time of major development of its connectivity with the prefrontal cortex could have stimulated the development of projections between the two structures, thus producing a long-term alteration of mPFC functioning, in particular the PL cortex, until adulthood.

At the behavioral level, we found two reliable effects of BLA Tsc2-KD: (1) A delayed fear extinction in BLA Tsc2-KD animals, whatever the age at which the virus was injected (PN25, PN50); (2) an overgeneralization of fear to an unknown tone stimulus specifically in animals for which BLA Tsc2-KD was induced at early adolescence (PN25). Except for slight discrepancies between the effects of the two active viruses, possibly due to off-target effects of each active virus, no effects of BLA Tsc2-KD were observed in animals' behavior during CS-US learning (day 2) and fear memory (first trials of day 3), nor at the level of fear to a new context, whether before (beginning of day 1) or after conditioning (beginning of day 3). As only 20% of BLA cells are engaged in the Pavlovian fear conditioning learning and extinction (Han et al. 2007), and given the known BLA's involvement in contextual fear (Chaaya et al. 2018), we could have expected changes in fear learning and memory. However, the observed normal fear learning to the CS and the context concurs with the lack of modification in overall BLA basal neural activity. The delayed fear reduction when repeating CS-noUS trials (day 3) in Tsc2-KD animals, whether injected at PN25 or PN50, could be related to a deficit in extinction learning, or to a strengthened fear expression. The similar levels of freezing observed in all groups during and 24h after fear conditioning, as well as 24h after extinction, rather support the hypothesis of a deficit in extinction learning. As no modification was observed in basal levels of neural activity in the BLA, the behavioral phenotype is unlikely reflecting a hyper-activity of BLA cells, but may rather reflect a modified responding of BLA cells to the CS during the acquisition of extinction. This retarded extinction could be due to a modified connectivity or cells' reactivity to the CS within BLA, especially given the rather posterior location of our injection sites (Zhang et al., 2019). Nevertheless, the fact that the mPFC-to-BLA connectivity undergoes significant pruning from PN45 to PN90 suggests this process might have been similarly affected in both groups of age (Cressman et al., 2010a; Cressman et al. 2010b), and could have thus resulted in a similar phenotype. Interestingly, it has recently been shown that recent recall of fear memory following a Pavlovian conditioning engages cells activity in the deep layers of PL cortex, whereas long-term recall of fear memory seems to be dependent of activity in layers II/III of PL cortex (Jacques et al. 2019). Whether, in our model, specific PL or IL layers are more engaged by the CS at the end of extinction, and whether the modified connectivity concerns the PL or IL afferents to specific cells in the BLA, and/or to within BLA

connectivity or cells' reactivity within the BLA, will need further investigation. Whether the same phenotype would have been observed if the injection had been done passed the latest development stage at which prefronto-amygdala connectivity is stabilized (e.g., after PN90) remains also an open question.

The second, likely most important, finding is the overgeneralization to a new auditory stimulus. This was specifically observed in *Tsc2*-KD BLA animals when injected early in adolescence (PN25). Generalization is often studied in relation to context, and when studied in relation to cued-fear memory, it is often in a discriminative setting where the animal has to learn that a CS+ predicts a US whereas a CS- predicts no-US, a paradigm which may involve more than generalization mechanisms (e.g., safety learning). Here, the animals were never exposed to this new stimulus, which had a higher frequency than the original CS in order to ensure good detection. The neural basis of cued fear generalization is still poorly understood (for a recent review, see Asok et al., 2019). Of most interest to us is the involvement of both the amygdala (Ghosh and Chattarji 2015, Resnik and Paz 2015), and the mPFC, in particular the PL (Concina et al. 2018; Vieira et al. 2015), as *Tsc2*-KD animals injected at adolescence showed higher basal neural activity in the PL cortex. The significant correlation found between the specific increase of basal c-FOS activity in layers II/III of PL cortex and the level of fear measured during the new tone presentation suggests a functional link between the basal level of cells' activity in middle layers of PL cortex and the PTSD-like overgeneralization of fear.

In all, our study shows that a precocious down-regulation of *Tsc2* in the basolateral amygdala during adolescence could exert a PTSD-like behavior following a threat later in adult life. The PTSD-like phenotype included delayed fear extinction and overgeneralization to a new stimulus when the down-regulation was induced at the time of development of connectivity between the amygdala and the prefrontal cortex (PN25), which also resulted in changes in basal neural activity in the prelimbic cortex. These changes are likely accompanied with changes in functional connectivity between the prefrontal cortex and basolateral amygdala, as well as cue-evoked cells' reactivity to auditory stimuli in both brain regions during fear conditioning, extinction and generalization, which needs to be confirmed in future research. Our findings indicate that early life *Tsc2*-related dysfunction in the amygdala may induce long-lasting vulnerabilities leading to a bias towards PTSD occurrence later in life. This could be a putative therapeutic target to treat or prevent the appearance of PTSD or other fear-related disorders related to an amygdala-prefrontal cortex pathway disruption, particularly those associated with TSC disease. Our experimental strategy brings forward a new type of animal model to study how specific genetic conditions, such as in cases of ASD in TSC patients, associated with environmental stressors, induces hyper-connectivity between the prefrontal

cortex and amygdala (Huang et al., 2016; Pagani et al. 2020), that may predispose to fear-related disorders such as PTSD at adult age.

Funding: FJ was supported by MESRI of France; FJ, LRJ and VD by PHC FASIC; VD and CV by Brainscopes. FJ, CV, NEM and VD by the CNRS.

Acknowledgments: We thank Nathalie Samson-Desvignes for her precious help in immunohistochemistry assessment, Véronique Rousseau for her help in molecular biology experiments, and the zootechnicians for their daily engagement in animal care.

FIGURES

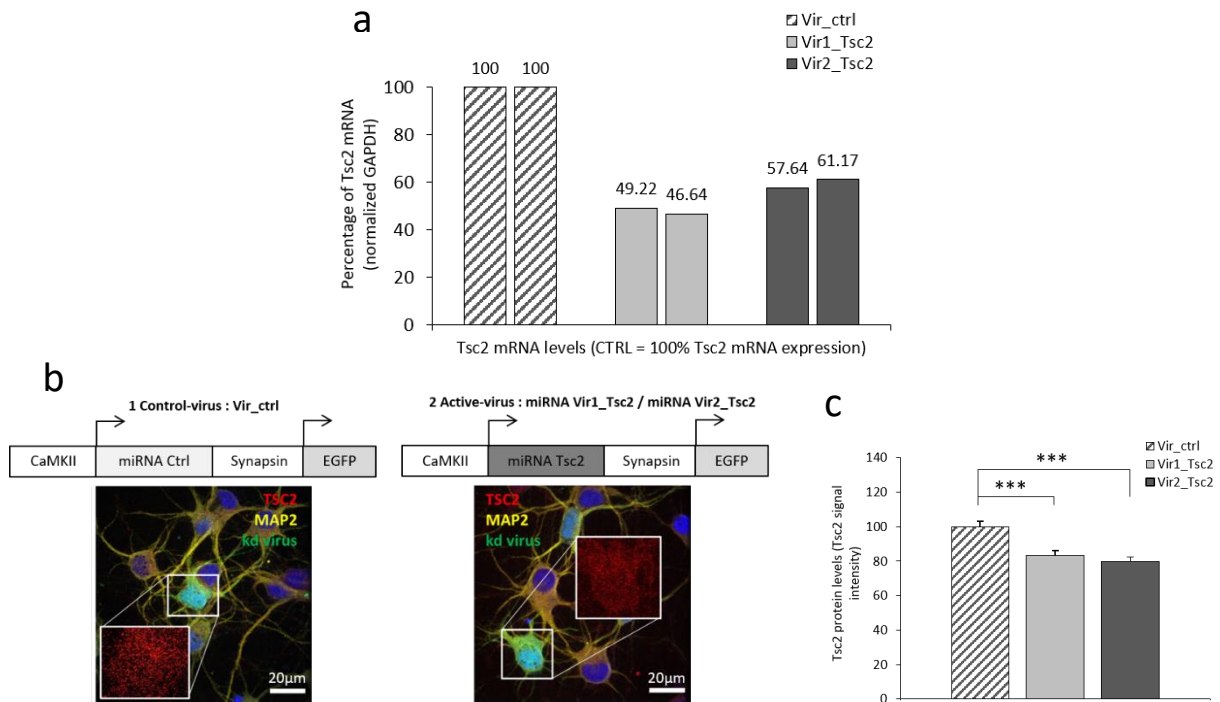


Figure 2.1. *In vitro* characterization of Tsc2-targeting virus efficiency. **(a)** Tsc2 mRNA expression levels in transduced primary cortical neurons. Histograms show the relative expression of Tsc2 mRNA measured in duplicate cell cultures of primary cortical neurons transduced with the 3 viruses. Tsc2 mRNA was detected by qPCR and normalized to GAPDH reporter gene expression. Tsc2 expression levels are presented as percent expression in neurons transduced by the control lentiviral vector. **(b)** Viral constructs and their expression in primary neuron cultures. Top diagrams show the lentiviral construction of the control virus (Vir_ctrl, left) and the two active viruses targeting Tsc2 (Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2, right). The three constructions expressed EGFP protein under the control of a rat synapsin promoter, targeting neuronal cells; both Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2 expressed a miRNA targeting Tsc2 under control of a mouse CamKII promoter, to constitutively activate the mTOR pathway within CamKII-expressing neuronal cells (see Supplementary Figure 2.1). Sample images below show immunoreactivity (IR) for Tsc2 protein (red), the neuronal marker Microtubule Associated Protein 2 (MAP2, yellow) and the viral EGFP expressed by the knock-down virus (kd virus, green) in primary hippocampal neurons transduced by Vir_ctrl (left) or Vir2_Tsc2 (right). Colocalization between Tsc2, MAP2 and EGFP is shown in cyan, DAPI nuclear stain in dark blue; the inset shows the punctuate IR of Tsc2 (red) in neuronal elements. **(c)** Tsc2 protein levels in primary hippocampal neurons. Histograms show Tsc2 protein expression analyzed in neurons transduced with either Vir_ctrl or one of the two Vir_TSC2 active lentiviruses, and quantified by measuring Tsc2 fluorescence signal intensity in transduced neurons. There was a significant decrease of Tsc2 protein levels in cells transduced by Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2 compared to control (Vir_ctrl, $n = 70$; Vir1_Tsc2, $n = 68$; Vir2_Tsc2, $n = 63$). (** $p < 0.001$; Holm *post hoc* comparisons).

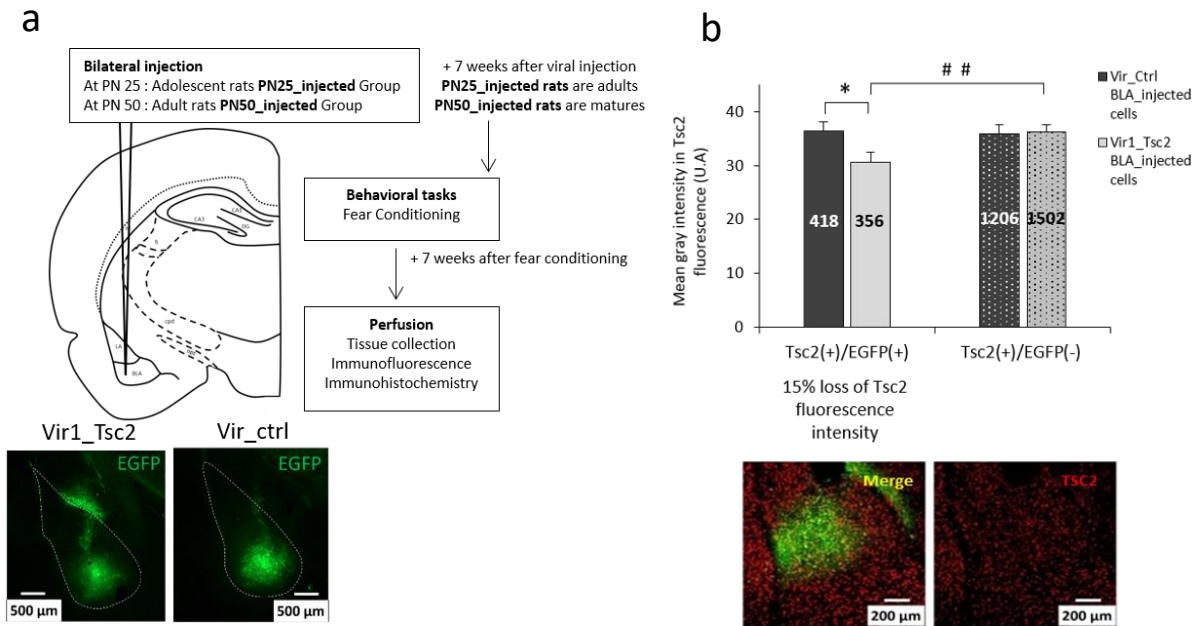


Figure 2.2. Ex vivo characterization of Tsc2-targeting virus efficiency following injection in basolateral amygdala. **(a)** Experimental procedure. The diagram (left) shows the procedure from lentiviral injection to tissue collection: Rats were bilaterally injected into the basolateral amygdala (BLA) with a lentiviral construction (Vir_ctrl, Vir1_Tsc2 or Vir2_Tsc2) during postnatal development when adolescent (at PN25), or young adults towards the end of brain development (PN50). We assessed fear behavior 7 weeks after lentiviral injection, i.e., once PN25_injected rats had reached the adult age (PN60) and adult rats a mature age (PN90). Fourteen weeks after injection, brain tissue sections were collected and immunofluorescence performed to appraise lentiviral efficiency in injected basolateral amygdalae. The sample images show lentiviral transduction efficiency in BLA cells from PN25 rats injected with Vir1_Tsc2 (left image) and Vir_ctrl (right image). **(b)** Semi-quantitative analysis of Tsc2 protein immunoreactivity in BLA. Histograms show Tsc2 mean gray fluorescence intensity measured in cells colocalizing viral EGFP and TSC2 fluorescence (Tsc2(+)/EGFP(+)) yellow) or non-transduced cells expressing only TSC2 (Tsc2(+)/EGFP(-)) in BLAs injected with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2. Sample images below the plots show corresponding examples for each condition (Tsc2: red; EGFP: green, Colocalization: Yellow). Note the significant decrease of Tsc2 fluorescence intensity selectively in Tsc2(+)/EGFP(+) cells transduced with Vir1_Tsc2 vector ($n = 6$ amygdala), but not in those transduced with Vir_ctrl ($n = 8$); (*, $p < 0.05$ unpaired t-test), associated with a decreased in Tsc2 intensity in EGFP(+) cells compared with EGFP(-) cells in BLA's injected with Vir1_Tsc2 (##, $p < 0.001$ paired t-test). Number of cells analyzed are noted within histogram bars.

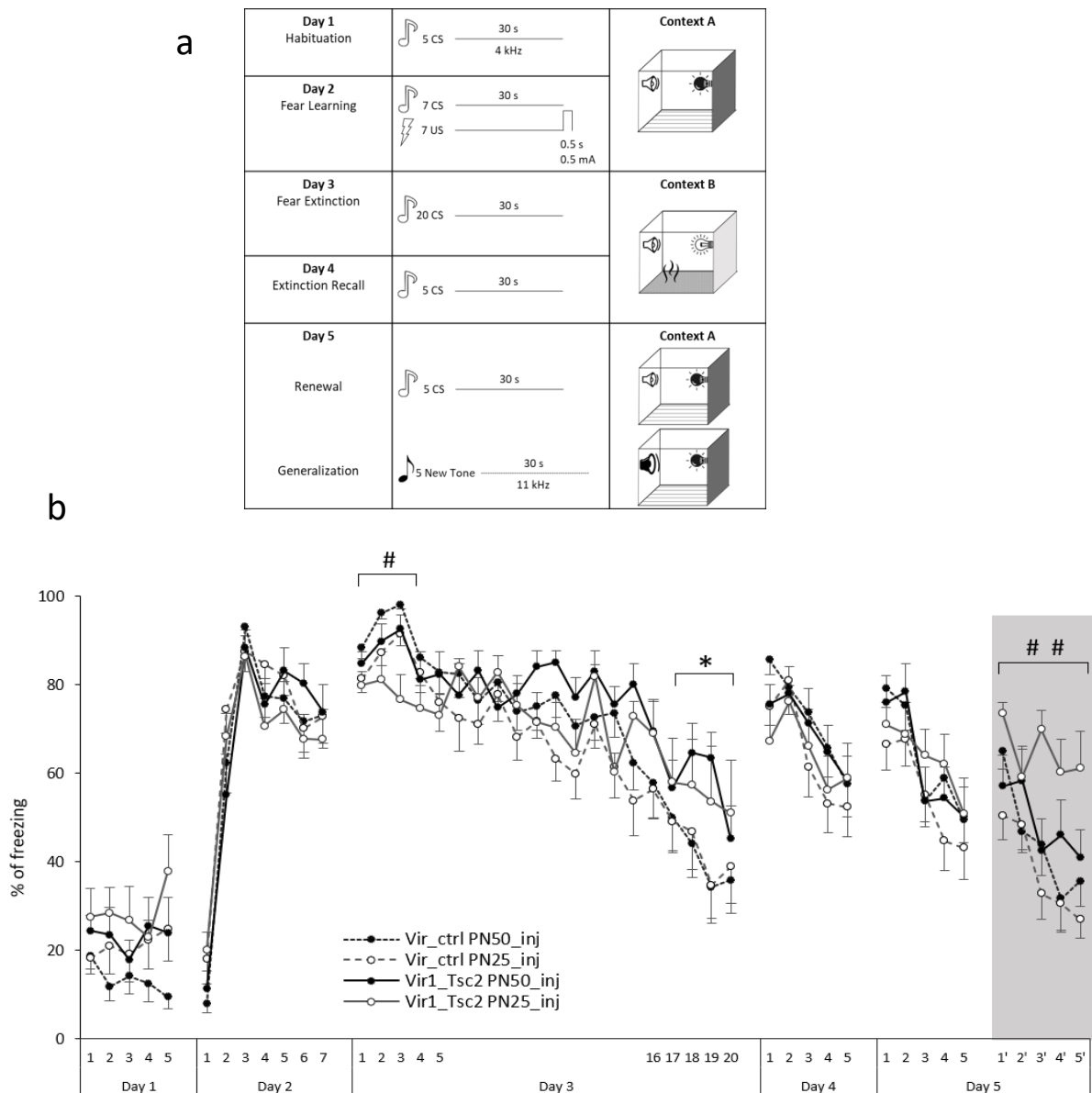


Figure 2.3. Overgeneralization to a new tone in rats injected with Vir1_Tsc2 at PN25. (a) Fear conditioning protocol. The protocol consisted in five consecutive days. Habituation (day 1) and Fear Learning (day 2) were conducted in context A, Extinction (day 3) and Extinction Recall (day 4) in context B. Fear Renewal (day 5) was performed in context A with presentation of the CS alone, followed immediately by generalization testing, consisting of five presentations of a new tone. **(b)** Rats injected with Vir1_Tsc2 at PN25 displayed retarded fear extinction and fear overgeneralization. The percent freezing to the 30s tone was measured for each trial in groups of rats injected with active (Vir1_Tsc2) and control (Vir_ctrl) viruses at PN25 or PN50, as indicated (Vir_ctrl PN25_inj, $n = 15$; Vir1_Tsc2 PN25_inj, $n = 10$; Vir_ctrl PN50_inj, $n = 11$; Vir1_Tsc2 PN50_inj, $n = 8$). Detailed statistics are provided in **Supplementary Table 1**. The significant differences were an effect of the age of injection during the first 5 trials of Day 3 with a higher level of freezing for PN50_injected compared to PN25_injected rats, whatever the viral condition (Holm *post hoc* test, #, $p = 0.016$) an effect of viral condition for the last 5 trials of Day 3 revealing a higher level of freezing in Tsc2-KD rats regardless of the age of injection, and

a age x trials x virus interaction during generalization testing (Day 5, highlighted in gray), revealing a higher level of freezing only in rats injected with Vir1_Tsc2 at PN25 (Holm *post hoc* test, ##, $p < 0.001$) compared to PN25 rats injected with Vir_ctrl.

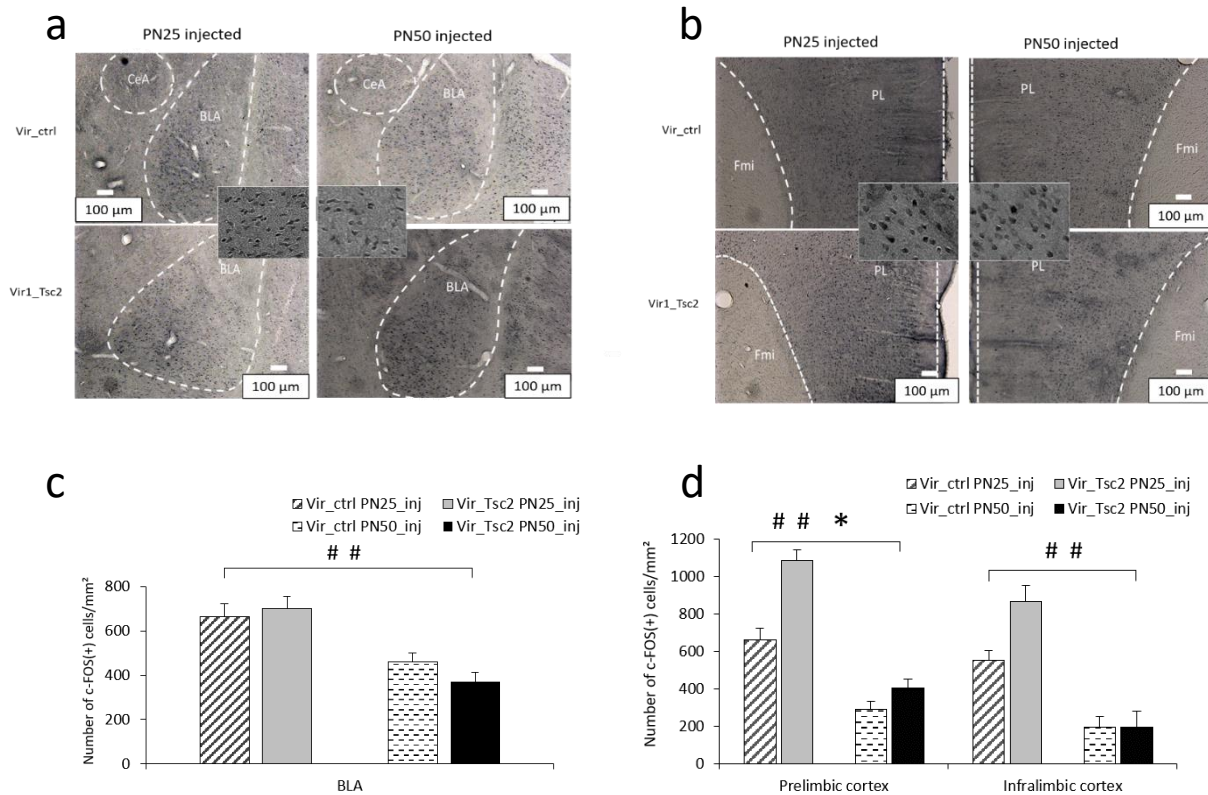


Figure 2.4: Basal neural activity was higher in prelimbic cortex later in adulthood in rats injected with an active virus in the BLA at PN25. (a) Sample images of c-FOS immunostaining in basolateral amygdala in rats injected with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 at PN25 (left panel) or PN50 (right panel). c-FOS(+) cells (black stain) were counted in basolateral amygdala near the site of injection. BLA: basolateral amygdala; CeA: Central Amygdala. **(b)** Sample images of c-FOS immunostaining in Prelimbic Cortex in rats injected with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 at PN25 (left panel) or PN50 (right panel). c-FOS(+) cells (black stain) were counted in prelimbic and infralimbic (not shown) cortices. **(c)** Density of c-FOS(+) cells in basolateral amygdala (BLA) of rats injected at PN25 or PN50 with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2. The histograms show the mean number of c-FOS-positive cells per square millimeter (Vir_ctrl PN25_inj, $n = 11$; Vir1_Tsc2 PN25_inj, $n = 14$; Vir_ctrl PN50_inj, $n = 8$; Vir1_Tsc2 PN50_inj, $n = 8$), near the site of injection. No differences were observed between viral conditions in the number of c-FOS(+) into the BLA, but only a simple age effect (##, $p < 0.001$, Holm *post hoc* test), revealing a higher c-FOS(+) cells density in BLAs for animals injected at PN25. **(d)** Density of c-FOS(+) cells in prelimbic and infralimbic cortices of rats injected at PN25 or PN50 with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2. The histograms show the mean number of c-FOS(+) cells per square millimeter in prelimbic (PL) or infralimbic (IL) cortices (Vir_ctrl PN25_inj, $n = 11$; Vir1_Tsc2 PN25_inj, $n = 16$; Vir_ctrl PN50_inj, $n = 8$; Vir1_Tsc2 PN50_inj, $n = 8$). There was a significant effect of the age of injection on c-FOS expression for both PL and IL cortices, with a higher number of c-FOS(+) cells for PN25_injected rats compared to PN50_injected rats, whatever the viral condition (Holm *post hoc* test, PL and IL, ##, $p < 0.001$), and a significant effect of viral condition for PL cortex (Holm *post hoc* test, *, $p = 0.002$).

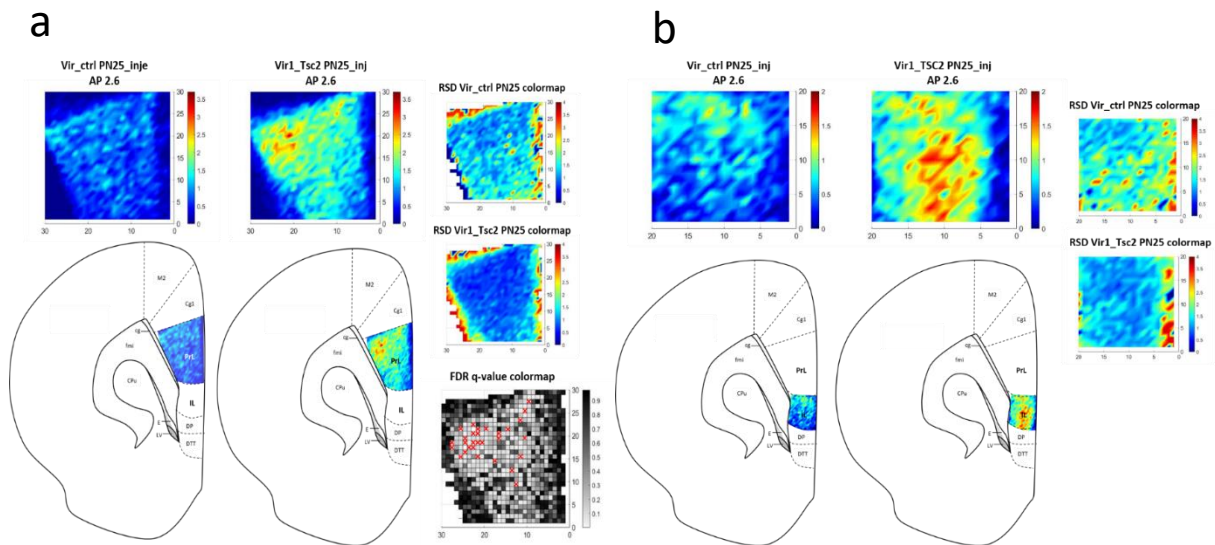


Figure 2.5. Density Heat Map of c-FOS-positive cells in prelimbic and infralimbic cortices in rats injected with Vir1_Tsc2 and Vir_ctrl in BLA at adolescence (PN25). (a) Density heat maps representing the mean distribution of c-FOS(+) cells in prelimbic cortex at antero-posteriority of 2.6 mm from Bregma (AP 2.6) of adult rats injected into the BLA during adolescence (PN25) (Vir_ctrl, $n = 11$ or Vir1_Tsc2, $n = 13$). Warmer colors indicate higher cell density. The “RSD heat maps” represent the Relative Standard Deviation (RSD) calculated for each bin for each viral condition, with warmer colors representing higher dispersion of data around the mean calculated in each bin. The FDR q -value map (in black and white) represents the q -values obtained in each tested bin from a False Discovery Rate (FDR) statistical test, following a significant interaction in the Two-Way RM ANOVA analysis of Density Heat Map; whiter colors represent q -values approaching significant differences; the 29 red crosses point to the significant differences detected between groups for each tested bin, with higher density of c-FOS(+) cells in rats injected in BLA with Vir1_Tsc2 compared to Vir_ctrl. (29 significant FDR q -values between $q < 0.0001$ and $q = 0.0086$). (b) Density heat maps representing the distribution of c-FOS(+) cells in infralimbic cortex at antero-posteriority 2.6 mm from Bregma (AP 2.6) of adult rats injected into the BLA during adolescence. with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2. Note that heat map color scales are different between prelimbic and infralimbic structures.

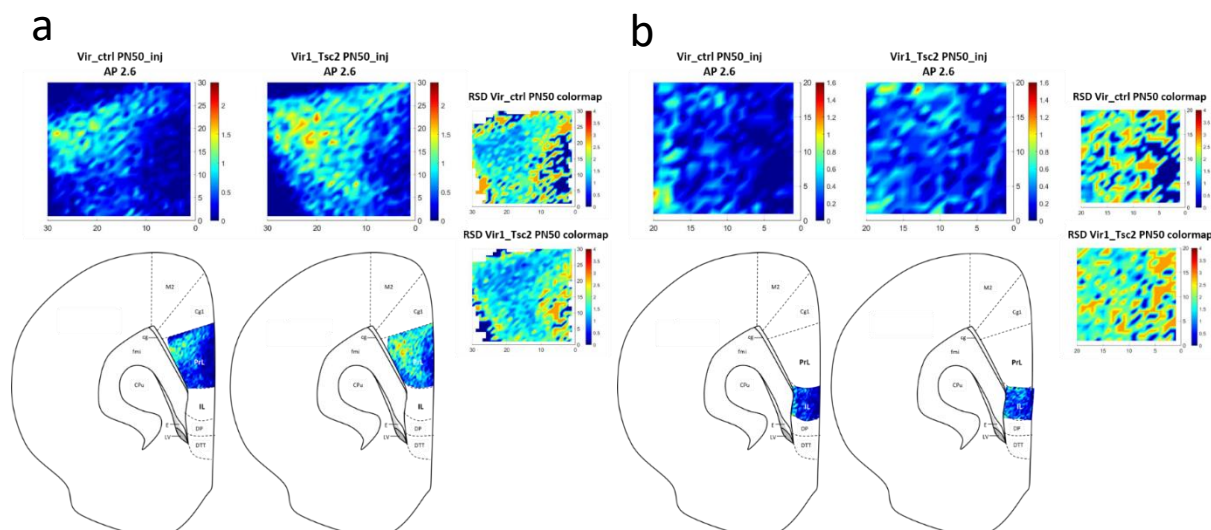


Figure 2.6. Density Heat Map of c-FOS-positive cells in prelimbic and infralimbic cortices in rats injected with Vir1_Tsc2 and Vir_ctrl in BLA at adulthood (PN50). (a) Density heat maps representing the mean distribution of c-FOS(+) cells counted in prelimbic cortex at antero-posteriority of 2.6 mm from Bregma (AP 2.6) of rats injected into the BLA during adulthood (Vir_ctrl, $n = 8$; Vir1_Tsc2, $n = 8$). Warmer colors indicate a higher cell density. RSD heat maps represent the Relative Standard Deviation (RSD) calculated for each bin in each viral condition, with warmer colors representing higher dispersion of data around the mean calculated in each bin. Statistical tests revealed no interaction or differences between viral conditions. (b) Density heat maps representing the mean distribution of c-FOS(+) cells counted in infralimbic cortex at antero-posteriority 2.6 mm from Bregma (AP 2.6) of rats injected into the BLA during adulthood (Vir_ctrl, $n = 8$; Vir1_Tsc2, $n = 8$). Statistical tests revealed no interaction or differences between viral conditions. Notice that heat map color scales differ between prelimbic and infralimbic structures, but also with PN25_injected animals.

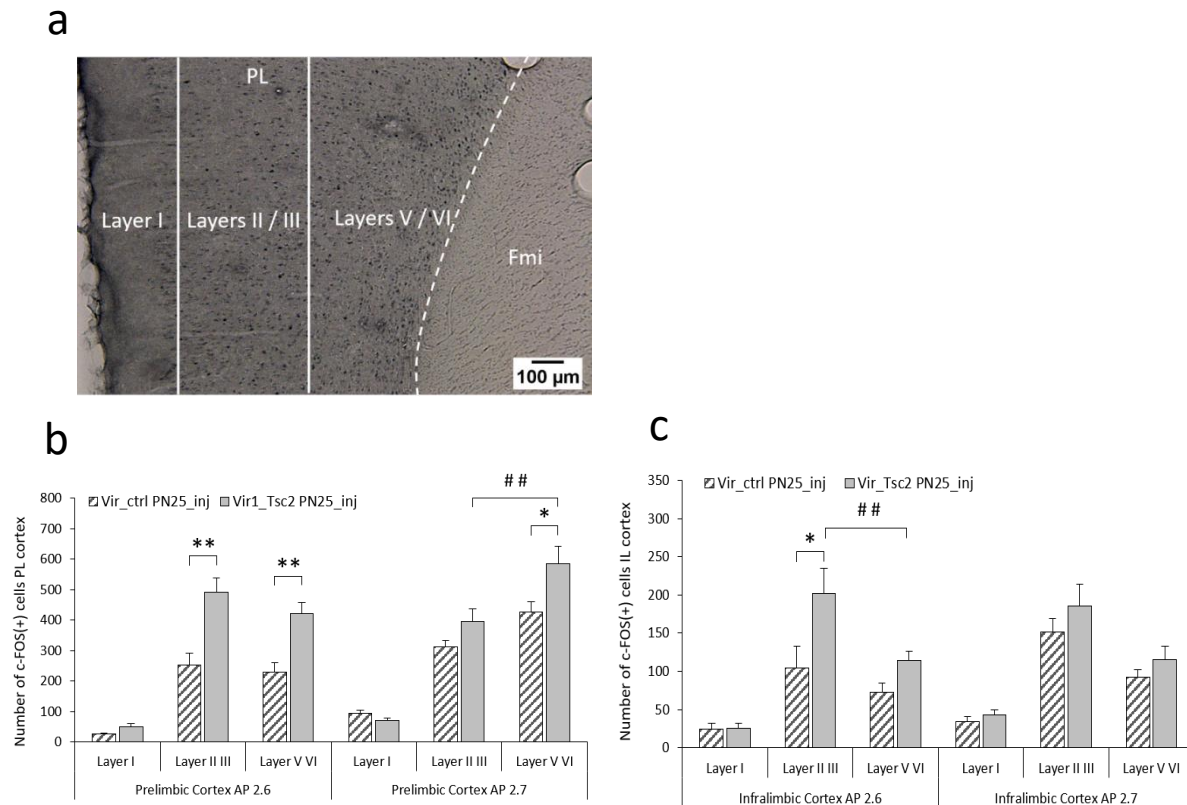
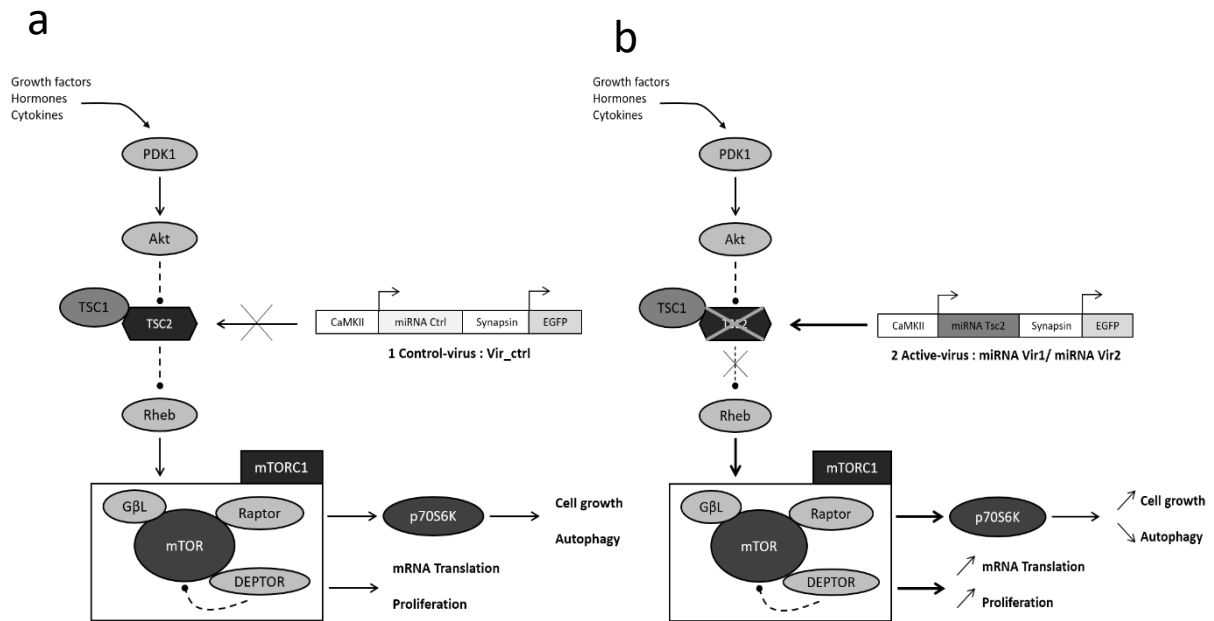
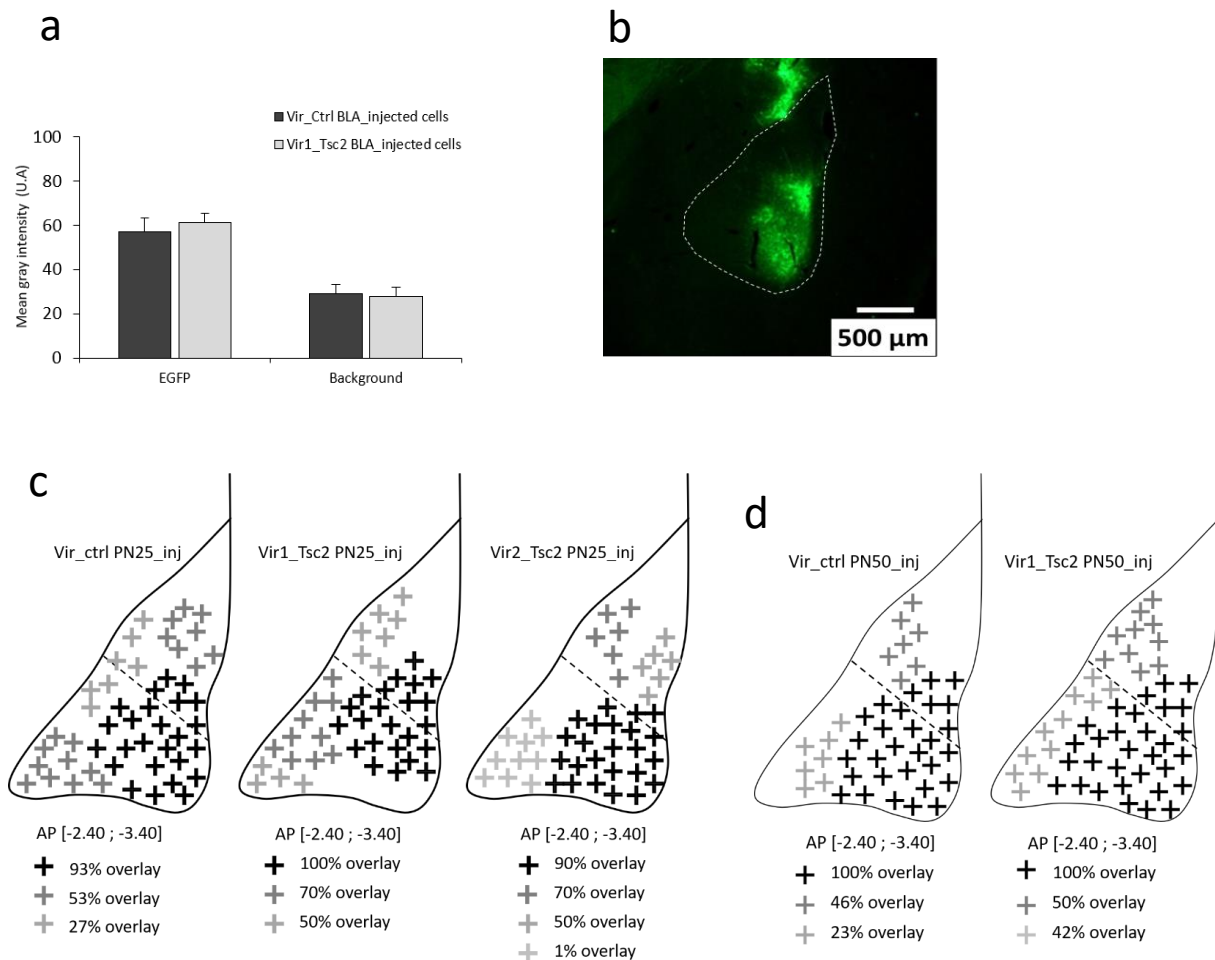


Figure 2.7: Number of c-FOS(+) cells in different cortical layers of prelimbic and infralimbic cortices in rats injected in the BLA during adolescence (PN25). (a) c-FOS immunostaining example image of a prelimbic cortex from a PN25_injected rat with Vir_ctrl showing the cortical layers delimitations (Adapted from Van Eden and Uylings, 1985, and Van de Werd et al., 2010). Layer I is a thin layer almost acellular; Layers II III and V VI are thicker and densely marked. Cortical layers II to VI are hardly distinguishable with a c-FOS immunostaining, sizes proportions described in literature has been used to do proper delimitations. (b) Layers II III and V VI of prelimbic cortex contained a higher number of c-FOS(+) cells in adult rats injected with Vir1_Tsc2 at adolescence (PN25). The histograms show the number of c-FOS(+) cells sorted depending on the origin belonging layers at Bregma 2.6 and 2.7 mm from most superficial (Layer I) to deeper (Layers V VI) layers. Rats injected with Vir1_Tsc2 showed a significantly higher number of c-FOS(+) cells in both layers II III and V VI at AP 2.6 (Vir_ctrl, $n = 10$; Vir1_Tsc2, $n = 16$), and in layer V VI at AP 2.7 (Holm *post-hoc* test, between Viral conditions, $**p < 0.001$; ; $*p = 0.037$; between layers for Vir1_Tsc2, $##p < 0.001$). (c) Layers II III of infralimbic cortex contained a higher number of c-FOS(+) cells in rats injected with Vir1_Tsc2 at adolescence (PN25). The histograms show the number of c-FOS(+) cells in infralimbic cortex sorted depending on their origin belonging layers at Bregma 2.6 mm and 2.7 mm. Rats injected with Vir1_Tsc2 showed a significantly higher number of c-FOS(+) cells in layers II III at AP 2.6 (Holm *post-hoc* test, between viral conditions, $*p = 0.008$; between layers for Vir1_Tsc2, $##p < 0.001$). (Vir_ctrl, $n = 11$; Vir1_Tsc2, $n = 13$).

SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplementary Figure 2.1. Lentiviral-vector mechanisms of action. Diagrams show the Tsc2/mTOR signaling pathway in baseline condition in presence of the inactive Vir_ctrl control vector (left) that only expresses EGFP, and in presence of the active vectors Vir1_Tsc2 or Vir2_Tsc2 (right) that expresses both EGFP and a miRNA targeting the Tsc2 protein. Tsc2 plays as a negative regulator of mammalian Target of Rapamycin (mTOR), a serine/threonine kinase participating in the formation of the protein complex mTORC1. When activated, the mTORC1 complex promotes protein synthesis and proliferation, as well as cell growth and autophagy through the activation of p70-S6 Kinase 1 (p70S6K). Hence, by reducing Tsc2 protein expression in transduced cells, the lentiviral constructions (Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2) induce a constitutive activation of the mTORC1 pathway.



Supplementary Figure 2.2. Ex vivo characterization virus transduction following injection in the basolateral amygdala. (a) Histograms showing EGFP fluorescence intensity and background gray intensity in BLA from rats injected at PN25 with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2. EGFP expression and background intensity did not differ between active and control viral conditions. (Unpaired t-tests; EGFP $t(12) = -0.516$; $p = 0.61$; Background ($t(12) = 0.218$; $p = 0.83$; Vir_ctrl, $n = 8$ BLA; Vir1_Tsc2, $n = 6$ BLA). (b) Sample image showing lentiviral transduction in basolateral amygdala (BLA) from PN25 rats injected with the second “active” virus (Vir2_Tsc2), as demonstrated by expression of EGFP. Green fluorescence above the BLA reflects cannula track. (c) Diagrams depicting the viral EGFP distribution in BLAs of animals injected at PN25 with Vir_ctrl, Vir1_Tsc2, or Vir2_Tsc2 observed at antero-posteriority from -2.40 to -3.40 millimeter posterior to Bregma ([-2.40; -3.40]). Percentages represent the proportion of animals presenting an overlying viral EGFP signal in distinct zones of the BLA, illustrated by different “+” symbols; numbers in parentheses specify to the number of animals in each group presenting EGFP(+) in the represented zone (for example, 14/15 in Vir_ctrl represents 14 animals expressing EGFP(+) in this zone amongst 15 animals). Dotted line delineates the separation between the lateral amygdala (above) and the basal amygdala (below). (d) Diagrams depicting the viral EGFP distribution in BLAs of animals injected at PN50 with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 observed at antero-posteriority from -2.40 to -3.40 millimeter posterior to Bregma ([-2.40; -3.40]). Percentages represent the proportion of animals

presenting an overlying EGFP fluorescence in distinct zones, numbers in parentheses specify the number of animals in each group presenting EGFP signal in the represented zone (for example, 13/13 in Vir_ctrl represents 13 animals expressing EGFP(+) in this zone amongst 13 animals). Dotted line delineates the separation between the lateral amygdala (above) and the basal amygdala (below).

a

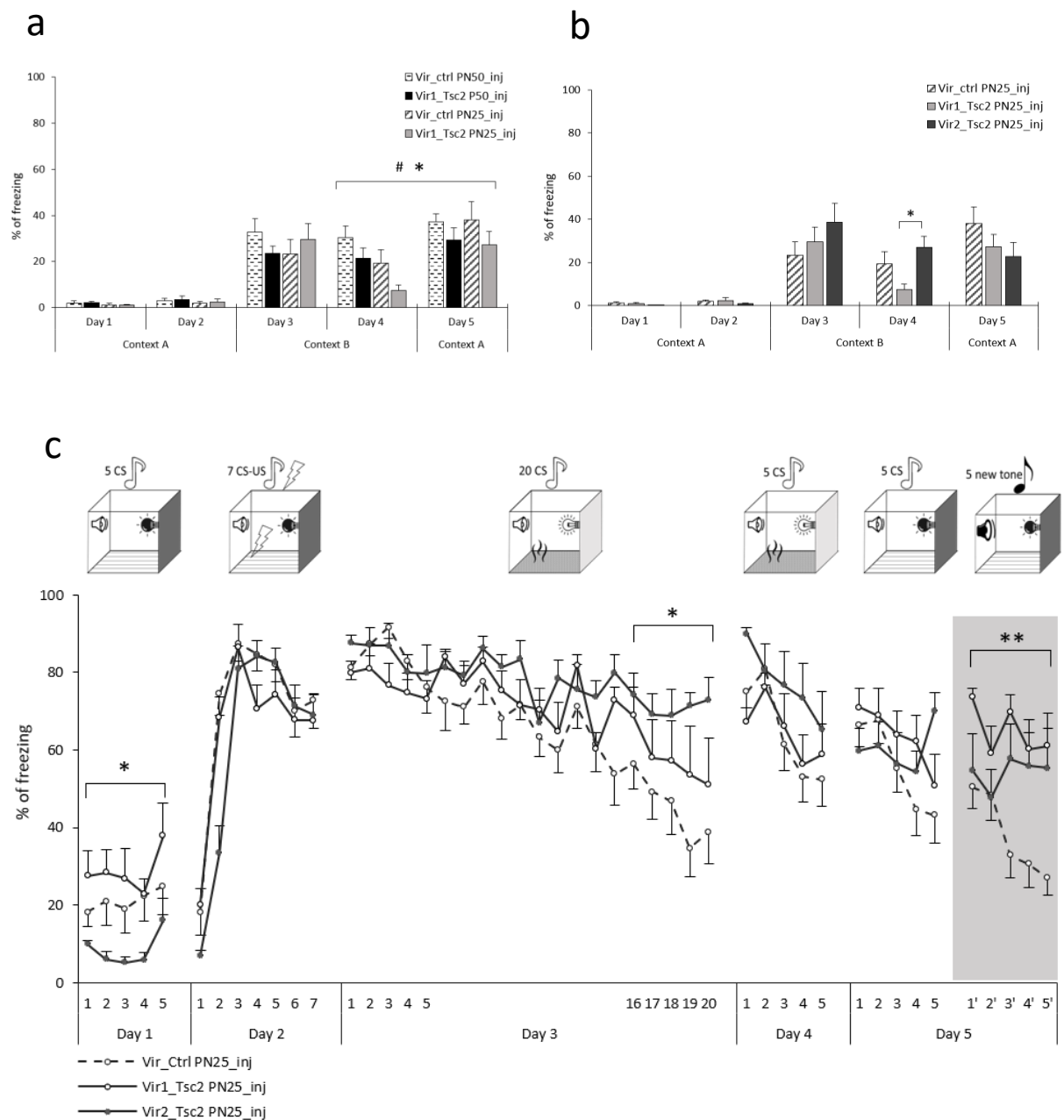
Three-Way ANOVA Fear conditioning. Percentage of freezing to context (=Day)	Day (within subject)	Viral Condition (between subject)	Age (between subject)	Day x Viral condition	Day x Age	Viral condition x Age	Day x Viral Condition x Age
Day 1 (context A)	X	F(1,41)=0.00420; p=0.949	F(1,41)=2.17001; p=0.148	X	X	F(1,41)=0.17257; p=0.680	X
Day 2 (context A)	X	F(1,46)=0.16417; p=0.687	F(1,46)=0.80675; p=0.374	X	X	F(1,46)=0.00814; p=0.929	X
Day 3 (context B)	X	F(1,46)=0.0533; p=0.819	F(1,46)=0.0766; p=0.783	X	X	F(1,46)=1.6912; p=0.200	X
Day 4 (context B)	X	F(1,46)=4.2697; p<0.044	F(1,46)=6.0024; p=0.018	X	X	F(1,46)=0.0850; p=0.772	X
Day 5 (context A)	X	F(1,46)=2.41200; p=0.127	F(1,46)=0.00944; p=0.923	X	X	F(1,46)=0.05896; p=0.809	X
Day 2 context A vs Day 3 context B	F(1,46)=63.00150; p<0.001	F(1,46)=0.0215; p=0.884	F(1,46)=0.2122; p=0.647	F(1,46)=0.00774; p=0.930	F(1,46)=0.09169; p=0.763	F(1,46)=1.6316; p=0.208	F(1,46)=1.61374; p=0.210
Day 4 context B vs Day 5 context A	F(1,46)=21.2168; p<0.001	F(1,46)=4.3165; p=0.043	F(1,46)=1.8292; p=0.183	F(1,46)=0.0270; p=0.870	F(1,46)=4.1221; p=0.048	F(1,46)=0.0950; p=0.759	F(1,46)=3.06e-6; p=0.999

b

Three-Way ANOVA Fear conditioning. Percentage of freezing to tone (=Trial)	Trial (within subject)	Viral Condition (between subject)	Age (between subject)	Trial x Viral condition	Trial x Age	Viral condition x Age	Trial x Viral Condition x Age
Day 1 - Habituation	F(4,164)=0.724; p=0.577	F(1,41)=3.3754; p=0.073	F(1,41)=2.0272; p=0.162	F(4,164)=0.622; p=0.647	F(4,164)=1.589; p=0.180	F(1,41)=0.0497; p=0.825	F(4,164)=0.713; p=0.584
Day 2 - Fear learning	F(6,276)=124.638; p<0.001	F(1,46)=0.2676; p=0.607	F(1,46)=0.0726; p=0.789	F(6,276)=0.953; p=0.457	F(6,276)=2.825; p=0.011	F(1,46)=0.4935; p=0.486	F(6,276)=0.638; p=0.700
Day 3 - Extinction 1-5	F(4,184)=7.771; p<0.001	F(1,46)=3.125; p=0.084	F(1,46)=6.289; p=0.016	F(4,184)=1.041; p=0.388	F(4,184)=0.528; p=0.715	F(1,46)=0.436; p=0.688	F(4,184)=0.409; p=0.802
Day 3 - Extinction 16-20	F(4,184)=9.790; p<0.001	F(1,46)=4.222; p=0.046	F(1,46)=0.0099; p=0.921	F(4,184)=1.580; p=0.182	F(4,184)=0.462; p=0.764	F(1,46)=0.0438; p=0.835	F(4,184)=0.0449; p=0.773
Day 4 - Extinction Recall	F(4,184)=16.338; p<0.001	F(1,46)=0.0642; p=0.801	F(1,46)=1.7856; p=0.188	F(4,184)=1.076; p=0.370	F(4,184)=0.981; p=0.419	F(1,46)=0.1129; p=0.738	F(4,184)=0.183; p=0.947
Day 5 - Renewal	F(4,184)=27.994; p<0.001	F(1,46)=0.482; p=0.491	F(1,46)=0.462; p=0.500	F(4,184)=0.288; p=0.885	F(4,184)=2.018; p=0.094	F(1,46)=0.721; p=0.400	F(4,184)=1.054; p=0.381
Day 5 - Generalization	F(4,184)=10.374; p<0.001	F(1,46)=14.03; p<0.001	F(1,46)=1.18; p=0.284	F(4,184)=1.340; p=0.257	F(4,184)=0.379; p=0.824	F(1,46)=7.25; p=0.010	F(4,184)=2.160; p=0.075

Supplementary Table 2.1: Detailed statistical analysis of the fear conditioning experiment. (a)

The table shows the F and p values obtained following two-way ANOVAs (Age x Viral condition) comparing the percent freezing to context (before the appearance of the first tone) for each testing day (day 1 to day 5), and planned three-way ANOVAs with repeated measures (day) comparing percent of freezing to context at Day 2 vs Day 3, or Day 4 vs Day 5 between rats injected with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 at PN25 or PN50. Characters in bold highlight significant differences. **(b)** The table shows the F and p values obtained following three-Way ANOVAs with repeated Measure (trials) comparing the percent freezing during each testing day (day 1 to day 5) between rats injected with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 at PN25 or PN50. Characters in bold highlight significant differences.



Supplementary Figure 2.3. Vir2_Tsc2 had similar effects than Vir1_Tsc2 on fear behavior in PN25_injected rats. (a) Enhanced reactivity to the initial learning context during renewal session in rats injected with the active virus at PN25. Percentage of freezing to context alone, measured before the first CS, for each experimental group (Vir_ctrl PN25_inj, $n = 15$; Vir1_Tsc2 PN25_inj, $n = 10$; Vir_ctrl PN50_inj, $n = 13$; Vir1_Tsc2 PN50_inj, $n = 12$) over the 5 days of the experiment (see protocol in **Figure 2.3a**). Planned comparisons showed no differential generalization of fear to the new context B on Day 3 (3-way ANOVA; Day 2 vs Day 3: (Day (2-3) x Condition x Age) interaction, $p = 0.210$; See **Supplementary Table 2.1a** for statistical details). In contrast, comparisons between Day 4 and Day 5 revealed a higher level of freezing in PN25_injected rats on Day 5, when animals were returned to the initial training context (3-Way ANOVA (Day (4-5) x Viral Condition x Age); Day (4-5) x Age interaction;

$F(1,46) = 4.1221$; $*p = 0.048$), and a lower level of freezing for animals injected with Vir1_Tsc2 whatever the age of injection (Viral condition effect, #, $p = 0.043$, 3-way ANOVA). *Post hoc* analyses revealed that PN25_injected rats had a higher level of freezing in Context A on Day 5 compared to context B (Day 4), suggesting a higher return of fear to the initial learning context for animals injected during adolescence. (Holm *post hoc* test; $*p < 0.001$; # $p = 0.043$). **(b)** Contextual fear compared between rats injected with Vir_ctrl, Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2 at PN25. In order to evaluate putative off-target effects, freezing responses to the context alone of PN25-injected animals were compared in three Viral Conditions (Vir_ctrl, $n = 15$; Vir1_Tsc2, $n = 10$; Vir2_Tsc2, $n = 10$). Vir2_Tsc2 animals injected at PN25 showed a higher level of fear to the extinction context on Day 4, 24 hours after extinction Day. (Helmert Contrast test Vir1_Tsc2 vs Vir2_Tsc2, $*p = 0.018$; See **Supplementary Table 2a** for context detailed statistics) **(c)** Rats injected with the second active virus (Vir2_Tsc2) at PN25 also showed retarded fear extinction and fear overgeneralization to a new tone. Percent freezing was measured as in **Figure 2.3b** (Vir_ctrl $n = 15$, Vir1_Tsc2 $n = 10$ or Vir2_Tsc2 $n = 10$). Supplementary Table 2b. Helmert contrast analysis showing a significant higher level of freezing for rats injected with Vir1_Tsc2 compared to Vir2_Tsc2 during habituation (Day 1, *, $p = 0.008$). However, fear learning (Day 2) was comparable among groups, and there was a higher level of freezing for both active viral conditions compared to control at the end of the extinction session on Day 3 (*, $p = 0.016$), as already shown for Vir1_Tsc2 in **Figure 2.3b**, and a higher level of freezing to the new tone during generalization testing on day 5 (highlighted in gray) for both Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2 injected animals as well (**, $p < 0.001$), reflecting an overgeneralization of cued fear in rats injected with active vectors at PN25.

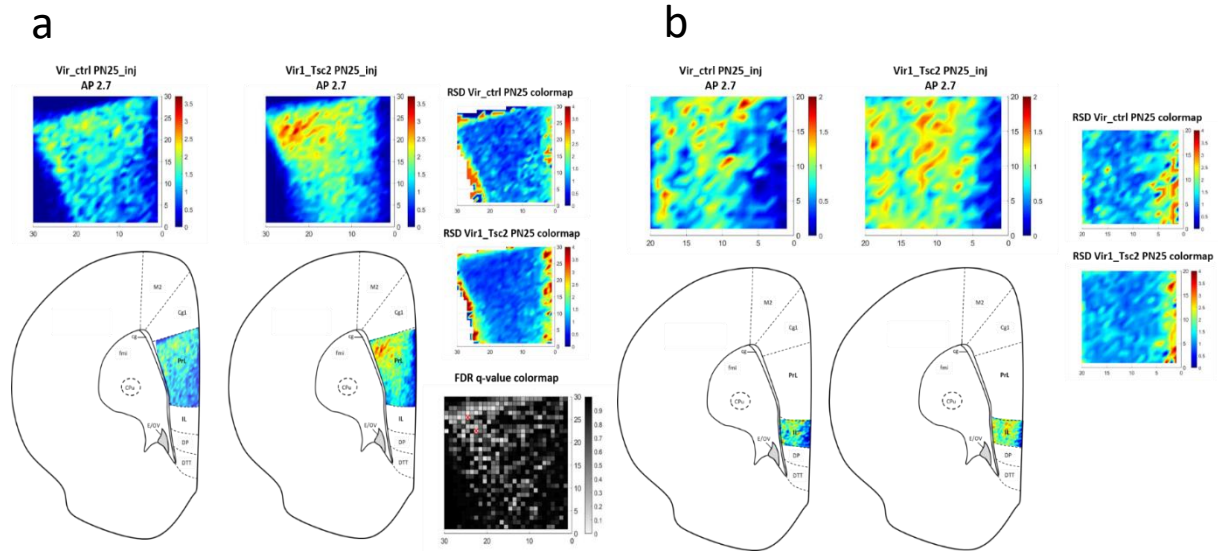
a

Helmert Contrast Test Percentage of freezing to context	CTRL vs Vir1, Vir2	Vir1 vs Vir2
Day 1 (context A)	t(32)=1.093; p=0.282	t(32)=1.041; p=0.306
Day 2 (context A)	t(32)=0.352; p=0.727	t(32)=0.906; p=0.372
Day 3 (context B)	t(32)= -1.301; p=0.203	t(32)= -0.832; p=0.412
Day 4 (context B)	t(32)=0.359; p=0.722	t(32)= -2.493; p=0.018
Day 5 (context A)	t(32)=1.550; p=0.131	t(32) = 0.358; p=0.722
Day 2 context A vs Day 3 context B	t(32)= -1.235; p=0.226	t(32)= -0.703; p=0.487
Day 4 context B vs Day 5 context A	t(32)=1.212; p=0.235	t(32)= -0.959; p=0.345

b

Helmert contrast test Percentage of freezing to tone	CTRL vs Vir1 , Vir2	Vir1 vs Vir2
Day 1 -Habituation	t(32)=0.447; p=0.658	t(32)=2.818; p=0.008
Day 2 - Fearlearning	t(32)=1.298; p=0.203	t(32)=0.607; p=0.548
Day 3 - Extinction 1-5	t(32)=0.827; p=0.414	t(32)=-1.444; p=0.158
Day 3 - Extinction 16-20	t(32)=-2.539; p=0.016	t(32)=-1.293; p=0.205
Day 4 - Extinction Recall	t(32)=-1.273; p=0.212	t(32)=-1.830; p=0.077
Day 5 - Renewal	t(32)=-1.063; p=0.296	t(32)=0.395; p=0.695
Day 5 - Generalization	t(32)=-4.587; p<0.001	t(32)=1.695; p=0.100

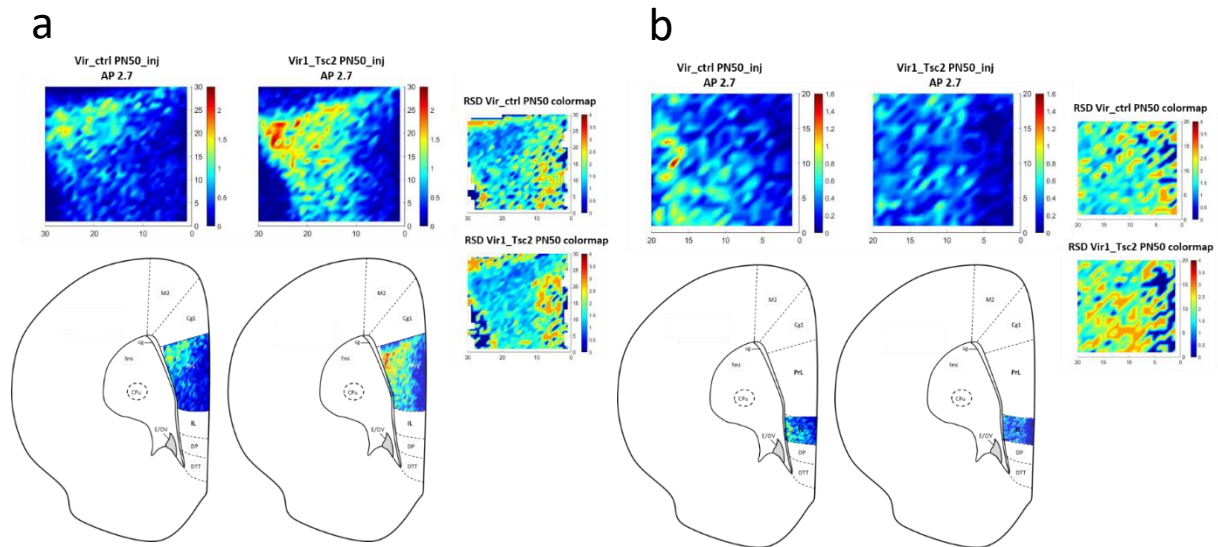
Supplementary Table 2.2: Helmert contrast analysis of percent freezing to context or to tones in rats injected at PN25. (a) Statistical table shows the t and p values obtained following a Helmert contrast test comparing the percent freezing at each context (before the presentation of the first tone) for each testing day (day 1 to day 5), and comparing the percent freezing to context day 2 vs day 3, or day 4 vs day 5, for animals injected with Vir_ctrl vs [Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2] (first column), and between Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2 animals (second column). Characters in bold highlight significant differences. **b)** Statistical table shows the t and p values obtained following a Helmert contrast test comparing the percent freezing to tone at each testing day for animals injected with Vir_ctrl vs [Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2] animals (first column), and between Vir1_Tsc2 and Vir2_Tsc2 animals (second column). Characters in bold highlight significant differences.



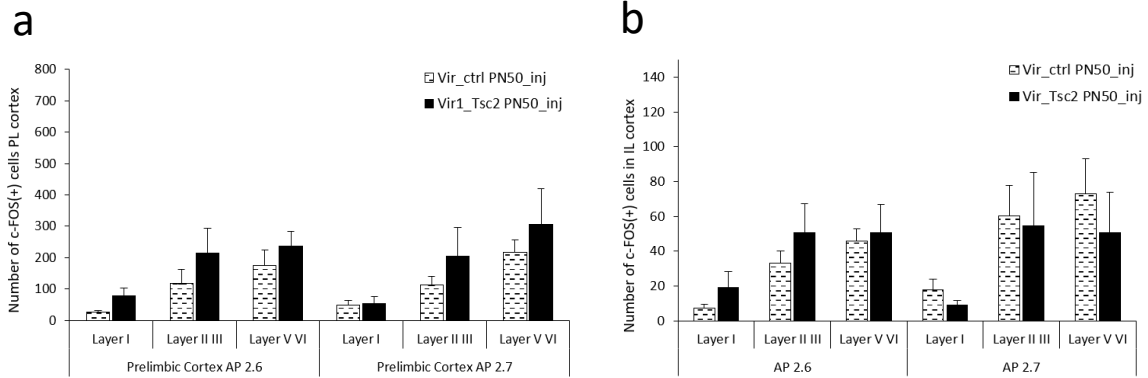
Supplementary figure 2.4. Density Heat Map of c-FOS-positive cells in prelimbic and infralimbic cortices from rats injected with Vir1_Tsc2 or Vir_ctrl in BLA at adolescence (PN25) at AP 2.7. (a) Density heat maps representing the mean distribution of c-FOS(+) cells in prelimbic cortex at antero-posteriority 2.7 mm from Bregma (AP 2.7) of adult rats injected into the BLA during adolescence (PN25) with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 (Vir_ctrl, $n = 10$; Vir1_Tsc2, $n = 16$). Warmer colors indicate a higher cell density. RSD heat maps represent the Relative Standard Deviation calculated for each bin in each viral condition, with warmer colors representing a higher dispersion of data around the mean calculated in each bin. The FDR q -value map in black and white represents the q -values obtained in each tested bin after a False Discovery Rate (FDR) statistical test, following a significant interaction in the Two-Way RM ANOVA analysis on Density Heat Map. Whiter colors represent q -values approaching significant differences. The two red crosses point to the bins where a statistical difference between viral conditions was found (829 bins analyzed; bin #603 $t(19896) = 4.744$; $q = 0.0017$; bin #695 $t(19896) = 4.322$; $q = 0.0065$). **(b)** Density heat map representing the mean distribution of c-FOS(+) cells in infralimbic cortex at antero-posteriority 2.7 from Bregma (AP 2.7) of adult rats injected with Vir1_Tsc2 or Vir_ctrl in BLA at adolescence (PN25) with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 (Vir_ctrl, $n = 10$; Vir1_Tsc2, $n = 16$). Notice that heat map color scale differs between prelimbic and infralimbic structures.

Two-Way Repeated Measures ANOVA : Density Heat Map	XY Coordinates effect	Viral Condition effect	XY Coordinates x Viral Condition
PN25_injected animals			
Prelimbic cortex AP 2.6	F(829,18238)=5.39; p<0.0001	F(1,22)=20.49; p=0.0002	F(829,18238)=1.49; p<0.0001
Infralimbic cortex AP 2.6	F(399,8778)=2.251; p<0.0001	F(1,22)=4.682; p=0.0416	F(399,8778)=1.191; p=0.0062
Prelimbic cortex AP 2.7	F(828,19872)=6.23; p<0.0001	F(1,24)=2.789; p=0.1079	F(828,19872)=1.42; p<0.0001
Infralimbic cortex AP 2.7	F(399,9576)=3.273; p<0.0001	F(1,24)=0.9255; p=0.3456	F(399,9576)=0.9738; p=0.6344
PN50_injected animals			
Prelimbic cortex AP 2.6	F(851,11914)=2.739; p<0.0001	F(1,14)=2.049; p=0.1743	F(851,11914)=0.928; p=0.9276
Infralimbic cortex AP 2.6	F(395,5530)=1.763; p<0.0001	F(1,14)=0.6347; p=0.4389	F(395,5530)=0.9346; p=0.8118
Prelimbic cortex AP 2.7	F(864,12096)=3.235; p<0.0001	F(1,14)=1.06; p=0.3206	F(864,12096)=1.045; p=0.1845
Infralimbic cortex AP 2.7	F(393,5502)=1.561; p<0.0001	F(1,14)=0.2877; p=0.6001	F(393,5502)=0.9726; p=0.6380

Supplementary Table 2.3: Statistical analysis of c-FOS(+) density heat maps from adult rats injected at PN25 or PN50. F and *p* values were obtained from a Two-Way RM ANOVA analyzing XY Coordinates (Within factor) x Viral Condition (Between factor) from density heat maps of c-FOS(+) cells counted in prefrontal and infralimbic cortices at both APs (2.6 and 2.7 mm from Bregma) for PN25 or PN50_injected rats. Characters in bold highlight significant values.



Supplementary figure 2.5. Density Heat Map of c-FOS-positive cells in prelimbic and infralimbic cortices in rats injected with Vir1_Tsc2 and Vir_ctrl in BLA at adulthood (PN50) at AP 2.7. (a) Density heat map representing the mean distribution of c-FOS(+) cells counted in prelimbic cortex at antero-posteriority 2.7 mm from Bregma (AP 2.7) of rats injected into the BLA during adulthood with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 (Vir_ctrl, $n = 8$; Vir1_Tsc2, $n = 8$). Warmer colors indicate a higher cell density. RSD heat maps represent the Relative Standard Deviation calculated for each bin in each viral condition, with warmer colors representing a higher dispersion of data around the mean calculated in each bin. Statistical tests revealed no differences between viral conditions in c-FOS(+) cells density. (b) Density heat map representing the mean distribution of c-FOS(+) cells counted in infralimbic cortex at antero-posteriority 2.7 mm from Bregma (AP 2.7) of rats injected into the BLA during adulthood with Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 (Vir_ctrl, $n = 8$; Vir1_Tsc2, $n = 8$). Statistical tests revealed no differences between viral conditions in c-FOS(+) cells density. Notice that heat map color scale differs between prelimbic and infralimbic structures, but also with heat map scales from PN25_injected animals.



Supplementary figure 2.6. Number of c-FOS(+) cells in different cortical layers of prefrontal and infralimbic cortices in rats injected in the BLA during adulthood (PN50). (a) Numbers of c-FOS(+) cells are not significantly modified within the cortical layers of prefrontal cortex in rats injected with Vir1_Tsc2 at adulthood (PN50). The histogram shows the number of c-FOS(+) cells sorted depending on the origin belonging layer at Bregma 2.6 and 2.7 mm from most superficial (Layer I) to deeper (Layers V VI) layers. No differences were observed between layers at both tested antero-posteriority. (b) Numbers of c-FOS(+) cells are not significantly modified within the cortical layers of infralimbic cortex in rats injected with Vir1_Tsc2 at adulthood (PN50). The histograms show the number of c-FOS(+) cells in infralimbic cortex sorted depending on their origin belonging layers at 2.6 mm and 2.7 mm from Bregma. (Vir_ctrl, $n = 8$; Vir1_Tsc2, $n = 8$).

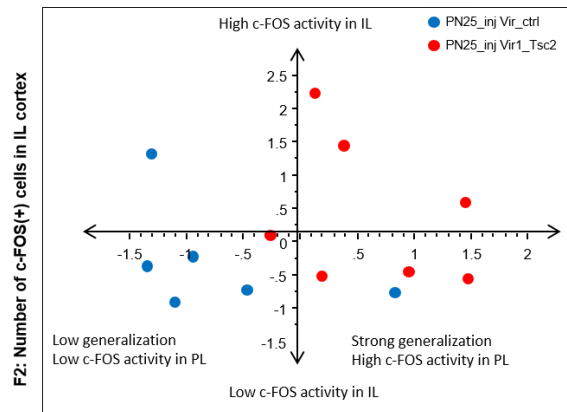
Two-Way Repeated Measures ANOVA : Cortical Layers	Layer effect	Viral Condition effect	Layer x Viral Condition
PN25_injected animals			
Prelimbic cortex AP 2.6	F(2,44)=79.054; p<0.001	F(1,22)=24.962; p<0.001	F(2,44)=7.729; p=0.001
Infralimbic cortex AP 2.6	F(2,44)=37.457; p<0.001	F(1,22)=4.682; p=0.042	F(2,44)=5.395; p=0.008
Prelimbic cortex AP 2.7	F(2,48)=93.591; p<0.001	F(1,24)=2.789; p=0.108	F(2,48)=4.147; p=0.022
Infralimbic cortex AP 2.7	F(2,48)=50.920; p<0.001	F(1,24)=0.925; p=0.346	F(2,48)=0.457; p=0.636
PN50_injected animals			
Prelimbic cortex AP 2.6	F(2,28)=21.542; p<0.001	F(1,14)=2.047; p=0.174	F(2,28)=0.498; p=0.613
Infralimbic cortex AP 2.6	F(2,28)=21.730; p<0.001	F(1,14)=0.635; p=0.439	F(2,28)=0.652; p=0.529
Prelimbic cortex AP 2.7	F(2,28)=27.395; p<0.001	F(1,14)=1.060; p=0.321	F(2,28)=1.517; p=0.237
Infralimbic cortex AP 2.7	F(2,28)=8.494; p=0.001	F(1,14)=0.293; p=0.597	F(2,28)=0.231; p=0.796

Supplementary Table 2.4: Statistical analysis comparing the number of c-FOS(+) cells in different layers of prelimbic or infralimbic cortices depending on the viral condition for both ages of injection at both antero-posteriority from Bregma. F and p values were obtained following a Two-Way RM ANOVA comparing cells distribution in cortical Layer (I, II/III and V/VI, Within factor) and viral condition (Between factor) at both APs for PN25 or PN50_injected rats. Characters in bold highlight significant effects.

a

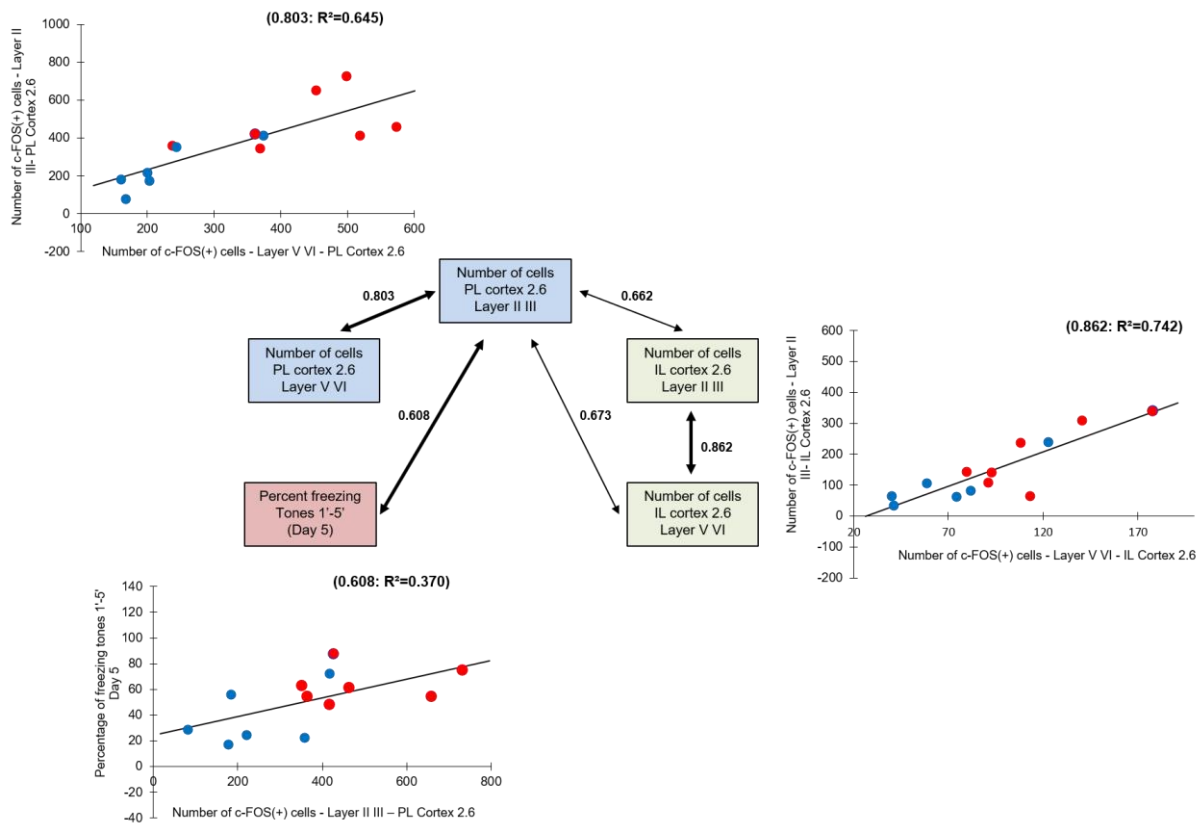
Variables	Factor 1	Factor 2
Nb c-FOS(+) cell PL II III	0.760	0.514
Nb c-FOS(+) cell PL V VI	0.911	0.169
% freezing tones 1'-5' Generalization (Day 5)	0.766	0.274
% freezing tones 16-20 Extinction (Day 3)	0.459	0.556
Nb c-FOS(+) cell IL II III	0.170	0.952
Nb c-FOS(+) cell IL V VI	0.360	0.870

b



F1: Number of c-FOS(+) cells in PL cortex / Freezing to tones 1'-5' Generalization testing

c



Supplementary figure 2.7. Principal Component Analysis and linear regression comparing freezing behavior and c-FOS counting in mPFC of PN25_injected animals. (a) Table recapitulating the weight of the six variables on the two principal factors extracted by Principal Component Analysis (PCA). The six variables are: Number of c-FOS(+) cells in PL or IL cortices in layers II-III or V-VI at AP 2.6 (4 variables) and percent freezing at the end of extinction (Day 3, Tones 16-20) or during generalization testing (Day 5, Tones 1'-5'). Animals used in this analysis were injected at PN25 with either Vir_ctrl or Vir1_Tsc2 (n Vir_ctrl PN25_inj = 6; n Vir1_Tsc2 PN25_inj = 7). Orange-highlighted cells correspond to the variables presenting strong correlation (>0.75) on one factor, and low correlation on

the other factor, which is used to interpret the factors. Factor 1 was mostly defined by the number of c-FOS(+) cells in layers of the PL cortex and the percent freezing during Generalization testing, whereas factor 2 was defined by the number of c-FOS(+) cells in the IL cortex. Percent freezing during extinction equally contributed to the two factors. **(b)** Scatter plot representing the distribution of individual factor scores in an orthogonal graphical representation (x: factor 1,y: factor 2) of the factor analysis. Animals injected at PN25 with Vir1_Tsc2 (red dots) showed rightward shift of their distribution as compared to rats injected with the control vector (blue dots), illustrating their higher level of freezing during generalization associated with higher number of c-FOS(+) cells in PL cortex. **(c)** The central diagram represents the significant correlations (> 0.60) among pairs of variables. Arrows on the diagram show the significant R^2 values (Pearson correlation test, $p < 0.05$) between two tested variables. The three plots illustrate the linear regression calculated for the three most relevant correlations (thicker arrows, bold characters) and their related R^2 values ($0.803, p = 0.001$; $0.608, p = 0.027$; $0.862, p = 0.0002$; Pearson correlation). In each plot, the black line represents the model of a $R^2 = 1$. Dots represent individual PN25_inj animals of Vir_ctrl (blue) and Vir1_Tsc2 (red) groups.

REFERENCES

- Arruda-Carvalho, Maithe, Wan Chen Wu, Kirstie A. Cummings, and Roger L. Clem. 2017. "Optogenetic Examination of Prefrontal-Amygdala Synaptic Development." *Journal of Neuroscience* 37(11): 2976–85.
- Asok, A., E. Kandel, and J. Rayman. 2019. "The Neurobiology of Fear Generalization." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12.
- Avital, Avi, and Gal Richter-Levin. 2005. "Exposure to Juvenile Stress Exacerbates the Behavioural Consequences of Exposure to Stress in the Adult Rat." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 8(2): 163–73.
- Bale, Tracy et al. 2010. "Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders." *Biological Psychiatry* 68(4): 314–19.
- Bergstrom, Hadley C., Craig G. McDonald, and Luke R. Johnson. 2011. "Pavlovian Fear Conditioning Activates a Common Pattern of Neurons in the Lateral Amygdala of Individual Brains." *PLoS ONE* 6(1).
- Bhutta, Adnan T., and K. J.S. Anand. 2002. "Vulnerability of the Developing Brain: Neuronal Mechanisms." *Clinics in Perinatology* 29(3): 357–72.
- Bick, Johanna, and Charles A. Nelson. 2016. "Early Adverse Experiences and the Developing Brain." *Neuropsychopharmacology* 41(1): 177–96.
- Blanchard, Robert J., and D. Caroline Blanchard. 1969. "Crouching as an Index of Fear." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 67(3): 370–75.
- Bouwmeester, H., G. Wolterink, and J. M. Van Ree. 2002. "Neonatal Development of Projections from the Basolateral Amygdala to Prefrontal, Striatal, and Thalamic Structures in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 442(3): 239–49.
- Bouwmeester, Hans, Kim Smits, and Jan M. Van Ree. 2002. "Neonatal Development of Projections to the Basolateral Amygdala from Prefrontal and Thalamic Structures in Rat." *Journal of Comparative Neurology* 450(3): 241–55.
- Bremner, J. Douglas, Bernet Elzinga, Christian Schmahl, and Eric Vermetten. 2007. "Structural and Functional Plasticity of the Human Brain in Posttraumatic Stress Disorder." *Progress in Brain Research* 167(Did): 171–86.
- Caballero, Adriana, Eden Flores-Barrera, Daryn K. Cass, and Kuei Y. Tseng. 2014. "Differential Regulation of Parvalbumin and Calretinin Interneurons in the Prefrontal Cortex during Adolescence." *Brain Structure and Function* 219(1): 395–406.
- Cassell, M. D., and D. J. Wright. 1986. "Topography of Projections from the Medial Prefrontal Cortex to the Amygdala in the Rat." *Brain Research Bulletin* 17(3): 321–33.
- Chaaya, Nicholas, Andrew R. Battle, and Luke R. Johnson. 2018. "An Update on Contextual Fear Memory Mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 92(May 2017): 43–54.

- Chaby, Lauren E., Heather C. Lasseter, Charles Geier, and Andreas Jeromin. 2020. "Determining Effects of Adolescent Stress Exposure on Risk for Posttraumatic Stress Disorder in Adulthood." *Current Opinion in Behavioral Sciences* 36: 79–89.
- Chini, Mattia, and Ileana L. Hanganu-Opatz. 2020. "Prefrontal Cortex Development in Health and Disease: Lessons from Rodents and Humans." *Trends in Neurosciences* : 1–14.
- Cisler, J. M. et al. 2016. "Changes in Functional Connectivity of the Amygdala during Cognitive Reappraisal Predict Symptom Reduction during Trauma-Focused Cognitive-Behavioral Therapy among Adolescent Girls with Post-Traumatic Stress Disorder." *Psychological Medicine* 46(14): 3013–23.
- Cloitre, Marylene et al. 2009. "A Developmental Approach to Complex PTSD: Childhood and Adult Cumulative Trauma as Predictors of Symptom Complexity." *Journal of traumatic stress* 22: 399–408.
- Concina, Giulia, Marco Cambiaghi, Annamaria Renna, and Benedetto Sacchetti. 2018. "Coherent Activity between the Prelimbic and Auditory Cortex in the Slow-Gamma Band Underlies Fear Discrimination." *Journal of Neuroscience* 38(39): 8313–28.
- Cressman, Victoria L., Jordan Balaban, Sara Steinfeld, Alexei Shemyakin, Peter Graham, et al. 2010a. "Prefrontal Cortical Inputs to the Basal Amygdala Undergo Pruning during Late Adolescence in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 518(14): 2693–2709.
- Cressman, Victoria L, Jordan Balaban, Sara Steinfeld, Alexei Shemyakin, Nelly Parisot, et al. 2010b. "Pruning During Late Adolescence in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 518(14): 2693–2709.
- Cunningham, Miles Gregory, Sujoy Bhattacharyya, and Francine Mary Benes. 2002. "Amygdalo-Cortical Sprouting Continues into Early Adulthood: Implications for the Development of Normal and Abnormal Function during Adolescence." *Journal of Comparative Neurology* 453(2): 116–30.
- van Eden, C. G., and H. B.M. Uylings. 1985. "Cytoarchitectonic Development of the Prefrontal Cortex in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 241(3): 253–67.
- Fenster, Robert J., Lauren A.M. Lebois, Kerry J. Ressler, and Junghyup Suh. 2018. "Brain Circuit Dysfunction in Post-Traumatic Stress Disorder: From Mouse to Man." *Nature Reviews Neuroscience* 19(9): 535–51.
- Ferreira, Ashley N., Hanna Yousuf, Sarah Dalton, and Patrick L. Sheets. 2015. "Highly Differentiated Cellular and Circuit Properties of Infralimbic Pyramidal Neurons Projecting to the Periaqueductal Gray and Amygdala." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9(APR): 1–15.
- Fusar-Poli, P. et al. 2011. "Neuroanatomy of Vulnerability to Psychosis: A Voxel-Based Meta-Analysis." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35(5): 1175–85.
- Gee, Dylan G. et al. 2013. "A Developmental Shift from Positive to Negative Connectivity in Human Amygdala-Prefrontal Circuitry." *Journal of Neuroscience* 33(10): 4584–93.
- Ghosh, Supriya, and Sumantra Chattarji. 2015. "Neuronal Encoding of the Switch from Specific to Generalized Fear." *Nature Neuroscience* 18(1): 112–20.

- Han, Jin Hee et al. 2007. "Neuronal Competition and Selection during Memory Formation." *Science* 316(5823): 457–60.
- Haruvi-Lamdan, Nirit et al. 2020. "Autism Spectrum Disorder and Post-Traumatic Stress Disorder: An Unexplored Co-Occurrence of Conditions." *Autism* 24(4): 884–98.
- Henigsberg, Neven, Petra Kalember, Zrnka Kovačić Petrović, and Ana Šečić. 2019. "Neuroimaging Research in Posttraumatic Stress Disorder – Focus on Amygdala, Hippocampus and Prefrontal Cortex." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 90(June 2018): 37–42.
- Herbert, Martha R. 2010. "Contributions of the Environment and Environmentally Vulnerable Physiology to Autism Spectrum Disorders." *Current Opinion in Neurology* 23(2): 103–10.
- Hermans, Erno J. et al. 2014. "How the Amygdala Affects Emotional Memory by Altering Brain Network Properties." *Neurobiology of Learning and Memory* 112: 2–16.
- Hoeffler, Charles A., and Eric Klann. 2010. "mTOR Signaling: At the Crossroads of Plasticity, Memory and Disease." *Trends in Neurosciences* 33(2): 67–75.
- Huang, Wen Chin, Youjun Chen, and Damon T. Page. 2016. "Hyperconnectivity of Prefrontal Cortex to Amygdala Projections in a Mouse Model of Macrocephaly/Autism Syndrome." *Nature Communications* 7: 1–15.
- Hwang, Soonjo et al. 2014. "Neurodevelopmental Changes in the Responsiveness of Systems Involved in Top down Attention and Emotional Responding." *Neuropsychologia* 62: 277–85.
- Jacques, Angela et al. 2018. "Functional Neuronal Topography: A Statistical Approach to Micro Mapping Neuronal Location." *Frontiers in Neural Circuits* 12(October): 1–14.
- Jacques et al. 2019. "Microtopography of Fear Memory Consolidation and Extinction Retrieval within Prefrontal Cortex and Amygdala." *Psychopharmacology* 236(1): 383–97.
- Johnson, Frances K. et al. 2018. "Amygdala Hyper-Connectivity in a Mouse Model of Unpredictable Early Life Stress." *Translational Psychiatry* 8(1).
- Ju, Xianshu et al. 2020. "The mTOR Inhibitor Rapamycin Prevents General Anesthesia-Induced Changes in Synaptic Transmission and Mitochondrial Respiration in Late Postnatal Mice." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14(January): 1–10.
- Kaiser, R. H. et al. 2018. "Childhood Stress, Grown-up Brain Networks: Corticolimbic Correlates of Threat-Related Early Life Stress and Adult Stress Response." *Psychological Medicine* 48(7): 1157–66.
- Khazipov, Roustem et al. 2015. "Atlas of the Postnatal Rat Brain in Stereotaxic Coordinates." *Frontiers in Neuroanatomy* 9(DEC): 1–5.
- Kolb, Bryan et al. 2012. "Experience and the Developing Prefrontal Cortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(SUPPL.2): 17186–96.
- Konstantoudaki, Anthippi et al. 2018. "Prefrontal Cortical-Specific Differences in Behavior and Synaptic Plasticity between Adolescent and Adult Mice." *Journal of Neurophysiology* 119(3): 822–33.

- Kriebel, Martin et al. 2011. "The Cell Adhesion Molecule Neurofascin Stabilizes Axo-Axonic GABAergic Terminals at the Axon Initial Segment." *Journal of Biological Chemistry* 286(27): 24385–93.
- Kriebel, Martin et al. 2020. "Interference With Complex IV as a Model of Age-Related Decline in Synaptic Connectivity." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13(March): 1–14.
- Ledoux, Joseph E. 1996. *The Emotional Brain*.
- Ledoux, Joseph E, and Joseph E Ledoux. 2000. "EMOTION CIRCUITS IN THE BRAIN." New York: 155–84.
- Li, Yong, Michael N. Corradetti, Ken Inoki, and Kun Liang Guan. 2004. "TSC2: Filling the GAP in the MTOR Signaling Pathway." *Trends in Biochemical Sciences* 29(1): 32–38.
- Liberzon, Israel, and Chandra Sekhar Sripada. 2007. "The Functional Neuroanatomy of PTSD: A Critical Review." *Progress in Brain Research* 167(07): 151–69.
- Marek, Roger, Li Xu, Robert K.P. Sullivan, and Pankaj Sah. 2018. "Excitatory Connections between the Prelimbic and Infralimbic Medial Prefrontal Cortex Show a Role for the Prelimbic Cortex in Fear Extinction." *Nature Neuroscience* 21(5): 654–58.
- Márquez, C. et al. 2013. "Peripuberty Stress Leads to Abnormal Aggression, Altered Amygdala and Orbitofrontal Reactivity and Increased Prefrontal MAOA Gene Expression." *Translational psychiatry* 3(July 2012).
- McDonald, Alexander J. 1984. "Neuronal Organization of the Lateral and Basolateral Amygdaloid Nuclei in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 222(4): 589–606.
- Morey, Rajendra A. et al. 2012. "Amygdala Volume Changes in Posttraumatic Stress Disorder in a Large Case-Controlled Veterans Group." *Archives of General Psychiatry* 69(11): 1169–78.
- Mukherjee, Arghya, and Pico Caroni. 2018. "Infralimbic Cortex Is Required for Learning Alternatives to Prelimbic Promoted Associations through Reciprocal Connectivity." *Nature Communications* 9(1).
- Neves, Laura Tartari et al. 2019. "Increases in Dendritic Spine Density in BLA without Metabolic Changes in a Rodent Model of PTSD." *Brain Structure and Function* 224(8): 2857–70.
- Ouimet, C. C., T. L. McGuinness, and P. Greengard. 1984. "Immunocytochemical Localization of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Rat Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(17 I): 5604–8.
- Pagani, Marco et al. 2020. "A Cross-species Link between MTOR-related Synaptic Pathology and Functional Hyperconnectivity in Autism." *bioRxiv*.
- Pavliša, Goran, Jurica Papa, Ladislav Pavić, and Gordana Pavliša. 2006. "Bilateral MR Volumetry of the Amygdala in Chronic PTSD Patients." *Collegium Antropologicum* 30(3): 565–68.
- Preibisch, Stephan, Stephan Saalfeld, and Pavel Tomancak. 2009. "Globally Optimal Stitching of Tiled 3D Microscopic Image Acquisitions." *Bioinformatics* 25(11): 1463–65.

- Rauch, Scott L., Lisa M. Shin, and Elizabeth A. Phelps. 2006. "Neurocircuitry Models of Posttraumatic Stress Disorder and Extinction: Human Neuroimaging Research-Past, Present, and Future." *Biological Psychiatry* 60(4): 376–82.
- Resnik, Jennifer, and Rony Paz. 2015. "Fear Generalization in the Primate Amygdala." *Nature Neuroscience* 18(2): 188–90.
- Rice, Deborah, and Stan Barone. 2000. "Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models." *Environmental Health Perspectives* 108(SUPPL. 3): 511–33.
- Ritov, Gilad, and Gal Richter-Levin. 2014. "Water Associated Zero Maze: A Novel Rat Test for Long Term Traumatic Re-Experiencing." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8: 1–6.
- Ronzoni, Giacomo, Alberto del Arco, Francisco Mora, and Gregorio Segovia. 2016. "Enhanced Noradrenergic Activity in the Amygdala Contributes to Hyperarousal in an Animal Model of PTSD." *Psychoneuroendocrinology* 70: 1–9.
- Rumball, Freya, Francesca Happé, and Nick Grey. 2020. "Experience of Trauma and PTSD Symptoms in Autistic Adults: Risk of PTSD Development Following DSM-5 and Non-DSM-5 Traumatic Life Events." *Autism Research*: 1–11.
- Saha, Rinki et al. 2017. "GABAergic Synapses at the Axon Initial Segment of Basolateral Amygdala Projection Neurons Modulate Fear Extinction." *Neuropsychopharmacology* 42(2): 473–84.
- Schindelin, Johannes et al. 2009. "Fiji - an Open Platform for Biological Image Analysis." *Nature Methods* 9(7).
- Shapiro, Lauren P., Ryan G. Parsons, Anthony J. Koleske, and Shannon L. Gourley. 2017. "Differential Expression of Cytoskeletal Regulatory Factors in the Adolescent Prefrontal Cortex: Implications for Cortical Development." *Journal of Neuroscience Research* 95(5): 1123–43.
- Shin, Lisa M., and Kathryn Handwerker. 2009. "Is Posttraumatic Stress Disorder A Stress-Induced Fear Circuitry Disorder?" *Journal of traumatic stress* 22(5): 409–15.
- Sierra-Mercado, Demetrio, Nancy Padilla-Coreano, and Gregory J. Quirk. 2011. "Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear." *Neuropsychopharmacology* 36(2): 529–38.
- Sigmundi, Ronald A., Mark E. Bouton, and Robert C. Bolles. 1980. "Conditioned Freezing in the Rat as a Function of Shock Intensity and CS Modality." *Bulletin of the Psychonomic Society* 15(4): 254–56.
- Tottenham, Nim, and Laurel Gabard-Durnam. 2017. "The Developing Amygdala: A Student of the World and a Teacher of the Cortex." *Current opinion in psychology* 17: 55–60.
- Tsoory, Michael, Hagit Cohen, and Gal Richter-Levin. 2007. "Juvenile Stress Induces a Predisposition to Either Anxiety or Depressive-like Symptoms Following Stress in Adulthood." *European Neuropsychopharmacology* 17(4): 245–56.

- Tzanoulinou, S., O. Riccio, M. W. De Boer, and C. Sandi. 2014. "Peripubertal Stress-Induced Behavioral Changes Are Associated with Altered Expression of Genes Involved in Excitation and Inhibition in the Amygdala." *Translational Psychiatry* 4(7): e410-9.
- Uematsu, Akiko et al. 2012. "Developmental Trajectories of Amygdala and Hippocampus from Infancy to Early Adulthood in Healthy Individuals." *PLoS ONE* 7(10).
- VanTieghem, Michelle, and Nim Tottenham. 2018. "Neurobiological Programming of Early Life Stress: Functional Development of Amygdala-Prefrontal Circuitry and Vulnerability for Stress-Related Psychopathology." *Curr Top Behav Neurosci.* 38: 117–36.
- Verwer, R. W.H., E. H.S. Van Vulpen, and J. F.M. Van Uum. 1996. "Postnatal Development of Amygdaloid Projections to the Prefrontal Cortex in the Rat Studied with Retrograde and Anterograde Tracers." *Journal of Comparative Neurology* 376(1): 75–96.
- Vieira, Philip A. et al. 2015. "Prefrontal NMDA Receptors Expressed in Excitatory Neurons Control Fear Discrimination and Fear Extinction." *Neurobiology of Learning and Memory* 119: 52–62.
- Vyas, A., A. G. Pillai, and S. Chattarji. 2004. "Recovery after Chronic Stress Fails to Reverse Amygdaloid Neuronal Hypertrophy and Enhanced Anxiety-like Behavior." *Neuroscience* 128(4): 667–73.
- Vyas, Ajai, Rupshi Mitra, B. S. Shankaranarayana Rao, and Sumantra Chattarji. 2002. "Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons." *Journal of Neuroscience* 22(15): 6810–18.
- Whitaker, Annie M., Nicholas W. Gilpin, and Scott Edwards. 2014. "Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights." *Behavioural Pharmacology* 25(5–6): 398–409.
- Zhang, Xiangyu, Joshua Kim, and Susumu Tonegawa. 2019. "Amygdala Reward Neurons Form and Store Fear Extinction Memory." *bioRxiv*.

CHAPITRE 3

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Les mécanismes qui prédisposent à l'apparition du syndrome de stress post traumatique (PTSD) à l'âge adulte restent à l'heure actuelle peu connus, même si les interactions entre les gènes et l'environnement semblent être impliqués. Cela dit, il est connu que des stress subis au cours des périodes juvéniles ou adolescentes favorisent le développement du PTSD à l'âge adulte, qui se manifeste au niveau neurobiologique par une hyper-réactivité (ou hyperactivité) amygdalienne, associée à une hypo-fonction du mPFC. Au vu des importantes modifications neurodéveloppementales qui ont lieu au cours de l'adolescence, marquée particulièrement par une immaturité des structures corticales par rapport aux structures limbiques, nous avons comme hypothèse qu'une modification sélective de l'activité de l'amygdale au cours de l'adolescence précoce (PN25) ou tardive (PN50) chez le rat pourrait conduire à l'apparition de troubles liés à la peur, et de symptômes typiques du PTSD à l'âge adulte en réponse à un évènement ayant une haute valence aversive. Au cours de ce travail de thèse nous avons perturbé l'activité des voies de signalisations impliquées dans la plasticité synaptique dans l'amygdale au cours de l'adolescence chez le rat, à l'aide d'un lentivirus induisant une diminution d'expression de la protéine Tsc2 dans le BLA. Nous montrons que ceci induit des modifications de l'activité des cellules du mPFC, mesurées au travers de l'expression de la protéine c-FOS, et que ces modifications sont associées à des déficits d'extinction de peur et une généralisation de la peur à l'âge adulte, comportement que nous caractérisons comme étant de type PTSD.

I. Discussion des résultats obtenus

A. Conséquences de la modulation de la voie Tsc2/mTOR dans l'amygdale sur l'activité cellulaire

1. Efficacité virale et voie de signalisation Tsc2/mTOR

Grâce aux études de quantification *in vitro*, nous avons démontré que la protéine Tsc2 était efficacement diminuée dans les cultures primaires corticales et hippocampiques infectées par le lentivirus, par rapport à celles transduites par un virus contrôle. Nous avons testé deux virus dont chacun exprimait un ARN interférant (ARNi) dirigé contre l'ARNm qui code pour la protéine Tsc2 dans le but de diminuer l'expression de la protéine. Chaque virus exprime une séquence d'ARNi différente qui cible l'ARNm de Tsc2 dans le but d'éliminer un potentiel effet *off-target*, ou « hors cible », c'est-à-dire un effet non-spécifique du virus actif qui serait indépendant de l'inhibition de TSC2. Nous avons ainsi noté que la diminution de l'ARNm de Tsc2 était plus marquée suite à la transduction par notre virus appelé « Virus 1 ». Ainsi, ce dernier a été le virus knockdown-Tsc2 (KD-Tsc2) utilisé tout au long de nos expériences de comportement de peur et pour nos analyses c-FOS. En parallèle, un groupe injecté à l'adolescence précoce (PN25) a été testé en comportement de peur à l'âge adulte avec le « Virus 2 » dans le but d'éliminer un effet off-target. L'observation des phénotypes étaient en grande partie comparables (extinction et généralisation de la peur) suite à l'injection de ces deux virus, indiquant que la diminution de Tsc2 dans les cellules du BLA est bien responsable du phénotype observé en tâche de comportement de peur et n'est pas dû à un effet off-target, non spécifique, du virus.

Les lentivirus KD-Tsc2 et contrôle expriment tous les trois la protéine fluorescente EGFP sous le contrôle du promoteur de la synapsine, et les virus actifs expriment un ARN interférant (ARNi) anti-Tsc2 sous le contrôle du promoteur de la calmoduline kinase II (CamKII). Cet ARNi anti-Tsc2 permet de diminuer de manière constitutive les taux de la protéine Tsc2 dans les cellules transduites exprimant la CamKII, ayant pour effet une activation constitutive de la voie mTOR. Alors que la synapsine est une protéine présente de manière ubiquitaire dans toutes les cellules neuronales (Michael RR, 2017) la CamKII et Tsc2 sont présentes en grande majorité

au sein des cellules excitatrices et à plus petite proportion dans les cellules GABAergiques (Butler et al., 2017; Ouimet et al., 1984; Wang et al., 2013). Toutefois, à notre connaissance, la proportion de cellules GABAergiques dans le BLA qui expriment à la fois la CamKII et mTOR n'est pas connue, mais cette proportion a été identifiée dans le cortex somatosensoriel (Choudhury et al., 2020, non examiné par des pairs). Nous savons également que les cellules GABA de l'amygdale (cellules intercalées, noyau central) et des structures voisines (striatum) expriment aussi la CamKII et la synapsine (Lugarà et al., 2019; C. C. Huang et al., 2014; Strobel et al., 2017; Benson et al., 1992; Xinjun Wang et al., 2013). Ainsi, ces deux structures peuvent présenter un marquage EGFP, dû au passage de la canule d'injection qui traverse le striatum et à la diffusion virale qui peut impacter les cellules intercalées. Cependant, l'expression commune de CamKII et mTOR/Tsc2 dans ces cellules et régions reste peu connue à ce jour. Sachant que le BLA est constitué à 80% de cellules pyramidales excitatrices, nous étions assurés que la transduction virale ainsi que l'expression de l'EGFP et de l'ARNi allaient être efficaces, sans néanmoins ignorer la possibilité que des cellules GABAergiques puissent également être affectées par une diminution de Tsc2. L'efficacité de transduction mesurée dans l'amygdale (environ 15-20% du total des cellules comptées) et la diminution significative de l'intensité de fluorescence Tsc2 dans les cellules transduites démontrent que le lentivirus s'est correctement intégré et est suffisant pour altérer les taux de la protéine. De plus, notre transduction virale affectait principalement les cellules du BLA, et dans une moindre mesure celles du LA en raison du passage de la canule d'injection. De plus, sachant que 20% des neurones du BLA sont suffisant pour induire un apprentissage conditionné, il semblait probable que cette intervention pouvait avoir un impact sur la fonctionnalité de l'amygdale et/ou sur celle des structures associées. Enfin, la transduction des virus (Vir1 et Vir2) et l'expression de leur ARNi et de l'EGFP, sous le contrôle des promoteurs de la CamKII et de la synapsine, assurent une efficacité de transduction durable et constitutive, et non transitoire. En raison de la nature du virus (lentivirus) et de la construction génique de nos vecteurs, leur capacité de transduction reste localisée autour du lieu d'injection et ils ne sont pas transportés de manière rétrograde vers une autre structure, risquant d'impacter l'activité cellulaire de structures voisines.

Comme indiqué au cours de l'introduction de cette thèse, la voie mTOR assure la survie cellulaire et le développement structurel et fonctionnel des structures du SNC. Les injections réalisées ont été appliquées au cours de l'adolescence précoce (PN25) et tardive (PN50) du rat

dans le but de cibler deux étapes différentielles du développement cérébral : à PN25 l'amygdale est suffisamment mature pour permettre l'apprentissage de peur conditionnée, mais le réseau constitué par le mPFC et l'hippocampe, qui exerce un contrôle sur l'activité de l'amygdale chez l'adulte, est encore très immature à l'adolescence, et n'est fonctionnel et de type adulte qu'à partir de PN55 pour l'hippocampe, et PN120 pour le mPFC. Les cellules du BLA ayant terminé leur phase de prolifération et de croissance avant PN25, le développement de leur arborisation se poursuit jusqu'à environ PN30 (Ryan et al., 2016). Il est donc peu probable que nous ayons augmenté le nombre total de cellules ou leur volume, mais possible que nous ayons perturbé le développement de l'arborisation dendritique. En effet, une augmentation globale de la croissance axonique, de l'arborisation dendritique et de l'excitabilité des cellules a été observée dans la littérature au niveau des cellules qui surexpriment mTOR: Il a été ainsi démontré sur les cellules corticales prélevées chez des souris modèles de sclérose tubéreuse à l'âge juvénile (PN11) que la croissance axonique était favorisée et ectopique (Choi et al., 2008), tandis que d'autres études ont montré à partir de prélèvement cortical d'enfants atteints de cette maladie une augmentation de la croissance dendritique et une hypertrophie des cellules pyramidales du cortex (Cepeda et al., 2003). Ces altérations morphologiques sont associées à une augmentation de l'expression des protéines activées par mTOR telles que S6K ou la protéine ribosomale S6 (Bateup et al. 2011; Talos et al. 2008), qui ont pour fonction de favoriser la croissance cellulaire, axonique et dendritique. De plus, la voie mTOR et les protéines S6K s'expriment de manière différentielle en fonction du développement cérébral, puisqu'elles sont régulées à la hausse dans le cerveau en développement précoce, avant d'atteindre un pic en phase juvénile tardive (PN16-21) puis de se stabiliser pour atteindre des niveaux d'expression de type adulte, ces phases d'expression coïncidant avec la synaptogénèse apparaissant dans les structures testées (néocortex, hippocampe) (Talos et al., 2012). Dans notre étude, une perturbation de la voie mTOR dans le BLA à PN25 chez le rat pourrait donc avoir altéré les processus de régulation de cette voie de signalisation apparaissant à l'adolescence précoce, en la favorisant de manière constitutive. De plus, les altérations morphologiques qui sont liées à une dérégulation de mTOR sont semblables à celles observées dans les modèles animaux de stress aigu et chronique, comme résumé dans la partie 3 de l'introduction.

Ceci dit, les voies de signalisation telles que mTOR sont extrêmement conservées dans la phylogénie et les mutations qui y apparaissent provoquent des effets délétères (malformations cérébrales) ou de profonds handicaps cognitifs, moteurs et émotionnels qui ne sont pas compensés par l'activité de régulateurs négatifs ou positifs de ces voies. Dans les maladies génétiques humaines et les modèles animaux de TSC, la totalité des cellules exprime ces mutations et les compensations ne sont pas correctement mises en place. Dans le cas d'une augmentation de la voie TSC2/mTOR sur un cerveau sain, les régulateurs négatifs sont nombreux, tels que les activateurs de TSC2 comme PI3K / Akt, AMPK ou GSK3 (Tsai et Crino, 2012) et il n'est pas à exclure que de potentiels mécanismes compensateurs se mettent en place dans notre modèle afin de limiter l'activité mTOR. Cela dit, notre localisation restreinte au BLA pourrait limiter les mécanismes compensateurs, qui agiraient localement et non de manière générale tel qu'observé dans les modèles déplétés en Tsc2 et qui concernent la totalité de l'organisme. De manière similaire, une hyper-excitabilité cellulaire dans un cerveau sain est généralement régulée par des processus de rétro-contrôles ou de feedforward négatifs de la part des interneurones inhibiteurs locaux ou des structures voisines, et peuvent être également mis en place dans notre modèle. En effet, même si les interneurones GABAergiques constituent 20% de la proportion des cellules du BLA, leur capacité inhibitrice est extrêmement efficace et robuste (Krabbe et al., 2018; Prager et al., 2016) en raison de leurs rôles de régulateurs d'activité des cellules excitatrices du BLA à la fois au repos mais aussi au cours des différentes tâches d'apprentissage et d'extinction de peur (Zhang et al., 2018, revue). Une perturbation dans la fonctionnalité du GABA peut subvenir en cas de stress, de traumatismes physiques, de dérégulation des mécanismes qui modulent l'activité GABA (neuromodulateurs, afférences des structures régulatrices), ou de déficits de mise en place aux membranes des récepteurs GABA aux membranes (Prager et al., 2016). Il est ainsi possible dans notre modèle que (1) l'hyperexcitabilité potentielle des cellules glutamatergiques transduites altère la fonctionnalité inhibitrice ou (2) la fonctionnalité inhibitrice est toujours efficace mais pas suffisante pour réguler l'activité des cellules transduites. De plus, des études ont montré à partir d'échantillons corticaux de patients TSC, une sous-expression des récepteurs GABAergiques, de l'enzyme productrice GAD67 et des vésicules transporteurs de GABA (VGAT) (Talos et al., 2008; White et al., 2001). Dans le cas où des cellules GABAergiques exprimant CamKII et TSC2 aient pu être transduites par le virus dans notre modèle, il serait donc possible que des altérations similaires

existent. Ainsi nous pourrions avoir augmenté à la fois l'excitabilité des cellules glutamatergiques et diminuer celle des GABAergiques, résultant en une augmentation de l'excitabilité globale du BLA.

2. Etude de l'activité c-FOS dans le BLA

Ainsi, dans un but initial de mettre en évidence l'augmentation de l'excitabilité de l'amygdale, et en regard des résultats obtenus au comportement de peur, nous souhaitions évaluer si l'activité du cortex préfrontal médian était également altérée. Pour cela, des quantifications de l'expression de la protéine c-FOS ont été réalisées dans l'amygdale, le PL et l'IL des animaux 14 semaines après l'injection du virus contrôle ou actif à PN25 ou PN50. A ce stade, les animaux injectés à PN25 ont environ 125 jours, et les animaux injectés à PN50 environ 150 jours. A notre connaissance, le développement cérébral a atteint sa maturation complète dans tous les cas, et les étapes de modifications structurelles, fonctionnelles et cognitives qui s'en suivent sont plutôt relatives à la plasticité de l'adulte tandis que celles liées au vieillissement ont lieu entre 12 et 22 mois chez le rat (Hamezah et al., 2017; Morterá et Herculano-Houzel, 2012).

De manière surprenante, le nombre de cellules c-FOS mesurées dans le BLA n'a pas dévoilé de modifications, quels que soient la condition virale et l'âge d'injection. Pourtant, il a été montré sur des prélèvements corticaux d'humains atteints de sclérose tubéreuse une augmentation de l'expression de c-FOS dans les cellules excitatrices, qui reflètent le caractère épileptogène de ces cellules (Wang et al., 2007). En effet, au niveau électrophysiologique, il a été montré que les cellules surexprimant mTOR présentent des flux calciques augmentés (Cepeda et al., 2003) et des réponses épileptiformes avec des courants synaptiques de longue durée (Wang et al., 2007) qui traduisent donc une haute excitabilité neuronale. Dans notre modèle, les cellules KD-Tsc2 pourraient également présenter un phénotype épileptogène, même si cette caractéristique n'a pas été observée au travers de la mesure de l'expression c-FOS dans le BLA, qui aurait pu être augmentée. Au niveau comportemental, aucun profil épileptogène n'a été observé chez nos rats, qu'ils soient au repos dans leur cage de vie ou lors des tâches de comportement.

Une autre étude sur des prélèvements corticaux de patients TSC a révélé une augmentation de l'expression de c-FOS uniquement dans les cellules dysplasiques, qui présentent une anomalie morphologique, et dans les cellules non-orientées qui ont eu une mauvaise polarité au moment du développement (Talos et al., 2008). A notre connaissance l'expression de c-FOS dans l'amygdale de patients TSC n'a pas été mesurée, possiblement du fait que les altérations de l'excitabilité des cellules sont majoritairement étudiées au niveau cortical, au sein des formations tubéreuses dont la maladie tire le nom. De manière similaire, l'expression des IEG dans les modèles animaux déplétés en Tsc1 ou Tsc2 n'a pas été analysée dans l'amygdale mais plutôt dans le cortex, le tronc cérébral, le cervelet ou l'hippocampe (Bateup et al., 2011; McMahon et al., 2015; Reith et al., 2013; Y. Wang et al. 2007). Dans notre modèle il est possible que l'expression de c-FOS ne soit pas le meilleur marqueur pour évaluer l'excitabilité cellulaire, d'autant plus si son expression est modulée selon l'altération morphologique ou de polarité. Une étude plus précise de la morphologie cellulaire, ou bien une mesure de la co-expression de c-FOS/EGFP par immunofluorescence pourrait être envisagée pour évaluer l'activité des cellules transduites par le vecteur.

La seule différence que nous ayons observée dépend de l'âge des animaux, avec une élévation de c-FOS spécifiquement pour les animaux injectés à PN25 quelle que soit la condition virale. Ceci pourrait suggérer que l'augmentation de l'activité cellulaire dans le BLA pourrait relever d'un impact différentiel de l'anesthésie et/ou de la chirurgie en fonction de l'âge des animaux. Enfin, une autre hypothèse serait qu'au niveau basal la voie mTOR altérée dans le BLA n'est pas suffisamment active pour induire une élévation de l'expression c-FOS, mais serait plutôt sur-réactive après excitation des neurones transduits, au travers de l'augmentation des flux calciques et de l'élévation de l'expression de la protéine CamKII. L'amygdale ne serait donc pas « hyperactive » mais « hyper-réactive ». Une mesure de cette expression après un stress ou un apprentissage conditionné pourrait être aussi envisagée afin de confirmer l'hyper-réactivité de l'amygdale après apprentissage aversif.

3. Etude de l'activité c-FOS dans le cortex préfrontal

Dans le PL et l'IL des animaux injectés à PN25 ou PN50, nous avons observé une élévation spécifique de l'expression c-FOS dans les couches profondes et médianes du PL et dans les couches médianes de l'IL, uniquement pour les animaux adultes injectés avec le virus actif à PN25. De plus, ces différences sont marquées par l'axe antéro-postérieur (AP), où ces taux d'expression sont différentiels entre le PL et l'IL. En effet, l'axe le plus postérieur (2.6) est marqué par une élévation des taux d'expression de c-FOS dans les couches II III et V VI du PL, et II III de l'IL, et l'axe le plus antérieur (2.7) par une élévation dans les couches V VI du PL uniquement. Ceci pourrait suggérer une différence fonctionnelle entre ces deux structures dans l'axe antéro-postérieur du mPFC, et possiblement d'une coactivation de ces deux structures, particulièrement dans l'AP la plus postérieure où les couches médianes du PL et de l'IL des animaux injectés par le virus actif présentent toutes les deux une élévation de la densité c-FOS. Ceci dit, un lien fonctionnel pourrait également être envisagé entre les couches V VI du PL et II III de l'IL, en regard aux corrélations significatives que nous avons obtenu entre ces deux structures, même si ces liens anatomiques spécifiques restent encore à élucider.

Enfin, en termes de différentiels d'expression c-FOS observés entre les animaux injectés par le virus KD-Tsc2 à PN25 ou à PN50, nous pouvons suggérer que l'altération au cours du développement cérébral ait favorisé le développement des projections entre le BLA et le mPFC qui dérégule l'équilibre d'activité du circuit, qui favoriserait le maintien de l'expression de la peur. En effet, c'est au cours de cette période d'adolescence que les fonctions excitatrices et inhibitrices des cellules du BLA mûrissent, que les projections BLA-PL et BLA-IL excitatrices se mettent en place, et que l'élagage synaptique des fibres en provenance du mPFC apparaît. La voie mTOR étant favorable à ces différents processus développementaux, et défavorable à l'élagage synaptique, les conséquences de son hyperactivation sur le développement se représenteraient ainsi :

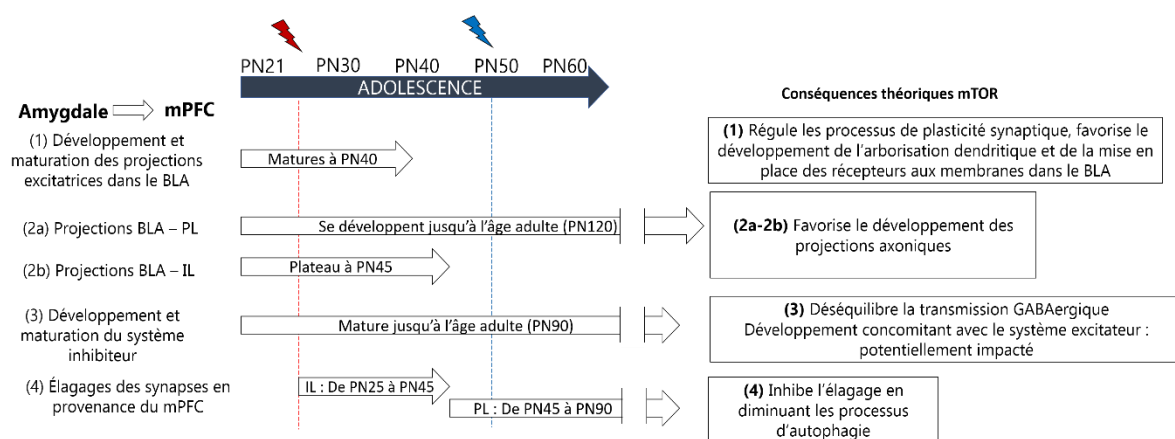


Figure 3.1 : Conséquences de la perturbation de la voie mTOR au cours de l'adolescence sur la fonctionnalité des cellules du BLA.

La flèche bleue représente la période d'adolescence du rat entre PN21 et PN60.

A gauche sont représentés les processus développementaux apparaissant dans le BLA et entre le BLA et le mPFC au cours de la période d'adolescence et décrits en introduction. A droite sont représentés les effets théoriques de la voie mTOR sur les processus développementaux associés qui peuvent expliquer les altérations fonctionnelles observées entre le BLA et le mPFC à l'âge adulte. Le symbole rouge et la ligne pointillée rouge représentent l'injection réalisée à PN25, le symbole bleu et la ligne pointillée bleue celle réalisée à PN50.

Au cours de l'adolescence, une hyperactivation de la voie mTOR aurait pour effet de (1) favoriser la transmission excitatrice des cellules du BLA ainsi que (2) le développement des projections axoniques vers le (a) PL et (b) l'IL ; (3) déséquilibrer la maturation GABAergique qui co-mature avec la transmission excitatrice et (4) inhibe l'élagage synaptique des fibres du PL et de l'IL, perturbant la fonctionnalité globale de l'amygdale.

Dans la finalité, une hyperactivation de la voie mTOR au cours du développement induirait une hyper-réactivité ou excitabilité des cellules du BLA, mais aussi du développement des projections vers le mPFC, résultant en une hyperactivité basale du mPFC, particulièrement du PL

L'injection réalisée à PN50 pourrait ainsi moduler le développement des projections axoniques vers le PL et défavoriser l'élagage synaptique des fibres du PL dans le BLA, mais n'influencerait pas les autres caractéristiques développementales apparaissant plus précocement. Ainsi les conséquences développementales et fonctionnelles sont moins marquées par rapport aux animaux altérés à l'adolescence précoce, puisque ces animaux ne présentent pas de différentiels d'activité c-FOS dans le mPFC, et seulement un déficit d'extinction de la peur en tâche de conditionnement Pavlovien.

B. Impact fonctionnel de l'activité c-FOS sur le comportement de peur

1. Conséquences fonctionnelles de l'activité c-FOS dans le mPFC sur le comportement de peur

Par rapport au comportement de peur, nous savons que l'activité du cortex prélimbique est associée au maintien de l'expression de la peur et de sa rétention en mémoire, et celle du cortex infralimbique à l'expression et la rétention en mémoire de l'extinction de la peur, et que ces activités sont régulées par les projections réciproques entre le PL et l'IL, entre le PL, l'IL, et le BLA, ainsi qu'au travers des projections unilatérales de l'hippocampe sur le PL et l'IL. Les niveaux d'expression différentiels des animaux injectés à PN25 avec le virus actif suggèrent dans un premier temps que l'activité de ces deux structures est affectée au niveau basal, mais les localisations exactes de cette perturbation restait à élucider. La poursuite de ces analyses de densité de cellules c-FOS(+) au travers des Heat Map nous a permis d'identifier plus précisément les zones affectées par ces modifications d'activité, qui correspondent tout particulièrement aux couches corticales associées au maintien de l'expression de la peur et de sa rétention en mémoire, en particulier pour les couches profondes du PL et médianes de l'IL. En effet, une augmentation de l'activité basale du PL dans les couches profondes, directement interconnectées avec le BLA, pourrait être en faveur de la résistance à l'extinction de la peur observées suite au conditionnement. Une augmentation de l'expression de c-FOS dans les couches médianes de l'IL, en revanche, pourrait par exemple refléter des mécanismes de compensation de l'IL sur l'activité du BLA, ou entre l'IL et le PL.

La majorité des études qui ont évalué les rôles du PL et de l'IL dans le comportement de peur altèrent la fonctionnalité globale de ces structures au travers de lésions, d'inhibitions ou d'activation pharmacologiques, optogénétiques ou chémogénétiques, sans nécessairement évaluer le rôle des couches cellulaires qui possèdent pourtant des connexions spécifiques et des rôles distincts. Cependant, de plus en plus d'études se penchent sur le sujet et apportent d'avantages d'informations sur les rôles fonctionnels des couches corticales du PL et de l'IL. En 2018, Mukherjee et Caroni ont étudié l'expression de c-FOS chez la souris au cours de différentes étapes d'un conditionnement Pavlovien de trace, après une séance d'acquisition de la peur, de son rappel 24h plus tard, de son extinction ou 14h après l'extinction, au moment

où les mécanismes cellulaires intervenant dans la consolidation de la mémoire à long terme atteignent un pic d'activité (Mukherjee et Caroni, 2018). Ils ont ainsi révélé l'apparition d'expressions c-FOS spécifiques à certaines couches cellulaires du PL et de l'IL (**Figure 3.2**). A noter cependant que le protocole de conditionnement utilisé par les auteurs est un conditionnement de trace, qui peut suggérer une fonctionnalité différentielle des structures du circuit de la peur, et en particulier de l'implication de l'hippocampe dans ce type de protocole. A notre connaissance, l'expression spécifique de c-FOS dans le PL ou l'IL après des séances d'apprentissage ou d'extinction de peur conditionnée classique n'ont pas été étudiés, mais elles l'ont été au travers de la mesure de l'expression de la MAPK, une protéine essentielle à la mise en place de la plasticité synaptique (Jacques et al., 2019). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'à la suite d'une séance de rappel d'un conditionnement Pavlovien simple chez le rat adulte, les taux de protéine MAPK étaient augmentés dans les couches profondes du PL. En parallèle, lors d'un test de rappel de la mémoire de peur 7 jours après le conditionnement, les auteurs ont montré une élévation des taux de MAPK dans les couches médianes du PL. Ainsi ces études permettent de mettre en évidence les couches cellulaires corticales dont l'activité pourrait être associée à la mise en place de la mémoire à court terme (couches profondes) et directement liées à l'expression comportementale de peur ; ou associées à la consolidation de la mémoire de peur et à son rappel (couches médianes).

Cependant, il est important de mentionner que ces analyses concernent l'activité des structures après un test de comportement, mais pas du niveau basal comme dans notre expérience. Cependant, les activités du PL et de l'IL en fonction de leur couche corticale après différentes étapes d'un protocole de conditionnement Pavlovien peuvent donner un aperçu des rôles de ces différentes couches cellulaires en fonction du profil comportemental.

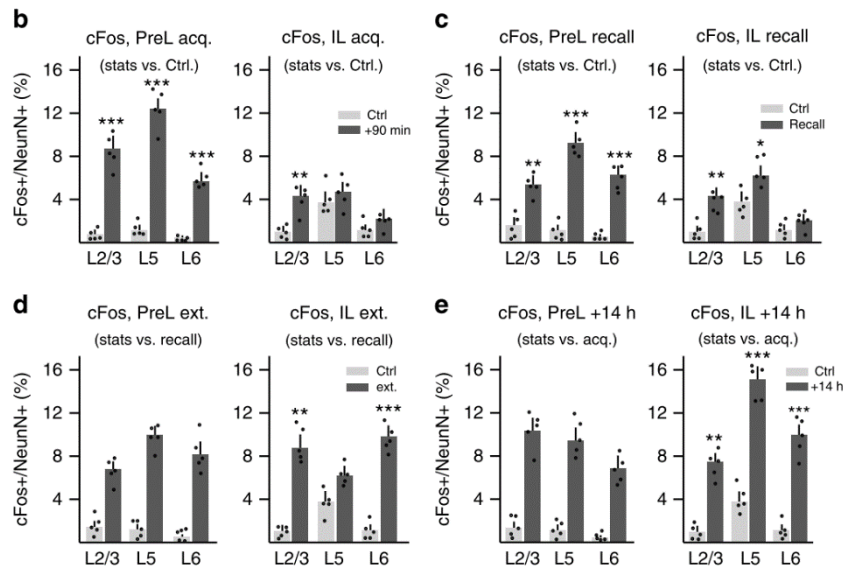


Figure 3.2 : Expression de c-FOS mesurée dans le PL et l'IL en fonction de la tâche comportementale en conditionnement de trace. Selon Mukherjee et Caroni, 2018.

Ces figures représentent l'expression de c-FOS en fonction des couches corticales du PL et de l'IL (b) après acquisition de la peur, (c) de son rappel, (d) de son extinction et (e) de sa mémoire, 14h plus tard. Les animaux contrôles n'ont pas été confrontés aux différentes tâches.

Ainsi nous pouvons observer qu'une élévation de l'intensité de peur après apprentissage active spécifiquement les couches 2 à 6 du PL, et uniquement 2/3 de l'IL (b), et que son rappel augmente à son tour l'activité de l'IL dans ses couches profondes (c). A l'inverse, l'extinction de la peur et sa mémoire favorisent l'activité globale de l'IL, de sa couche 2 à sa couche 6 mais ne provoque pas de différentiels dans l'activité du prélimbique, en comparaison avec les résultats obtenus après acquisition (d,e).

En regard de ce qui a été observé par Mukherjee et Caroni, nous pourrions dire que dans notre étude, l'expression c-FOS au niveau basal semble refléter les résultats observés par les auteurs après acquisition de la peur conditionnée, voire de son rappel. De même pour les observations de Jacques et collaborateurs en 2019, une élévation de l'activité cellulaire des couches profondes et médianes du PL favoriseraient le maintien de la mémoire de peur à court et long terme. Ceci pourrait ainsi suggérer que dans notre étude, l'augmentation de l'activité basale des couches moyennes et profondes du PL et médianes de l'IL seraient favorables à une élévation de l'intensité de la peur.

Concernant l'aspect fonctionnel qui sous-tend l'augmentation spécifique de l'activité c-FOS dans les couches profondes du PL et moyennes de l'IL des animaux injectés à l'adolescence

précoce, il est possible qu'au niveau basal et au cours du développement cérébral, le BLA hyper-réactif ait favorisé l'activité des cellules de la couche profonde du cortex prélimbique avec lesquelles il possède des connexions réciproques. Les connexions réciproques BLA – Couche III de l'IL lors des analyses du développement des projections n'ayant pas été dévoilées, (Ferreira et al., 2015 ; Krettek et Price, 1977) il est donc peu probable que la différence d'expression c-FOS observée dans les couches moyennes de l'IL soit directement due à l'activité amygdalienne. En revanche, il a été démontré qu'il existait des projections denses et réciproques entre le PL et l'IL au niveau des couches II-III et V-VI (Marek et al., 2018), et dans notre étude nous avons détecté une corrélation significative entre le nombre de c-FOS dans les couches V-VI du PL et II-III de l'IL, sans toutefois que nous ne connaissions l'existence de telles projections, puisqu'elles ne sont pas documentées dans la littérature. En parallèle, il a été récemment démontré que le cortex prélimbique a des rôles dans l'activation de l'IL au cours de l'extinction de la peur, au travers de l'activation des cellules pyramidales de la couche V-VI de l'IL (Marek et al., 2018).

Il serait alors tout à fait envisageable dans notre modèle que l'augmentation de l'activité c-FOS dans les couches profondes du PL serait responsable du maintien de l'expression de la peur ou de sa rétention en mémoire, tandis que l'augmentation de l'activité c-FOS dans les couches médianes du PL et de l'IL pourraient soit démontrer une prédisposition à maintenir en mémoire des éléments aversifs au travers de l'activité des couches médianes du PL, soit refléter une augmentation de la transmission inhibitrice du PL vers l'IL. En effet, l'élévation de c-FOS n'est pas nécessairement due à une augmentation de l'activité des cellules excitatrices, puisqu'il a été montré dans le cortex ou l'hippocampe que les interneurons GABAergiques peuvent également exprimer la protéine c-FOS (Doron et Rosenblum, 2010; Staiger et al., 2002; Wang et al., 2016). Cependant, cette hypothèse reste à tester dans notre modèle puisque l'élévation de l'activité dans la couche III de l'IL pourrait aussi sous-tendre des mécanismes de compensation de l'IL sur l'activité du BLA et du PL. Cela dit, si le circuit composé du BLA – Couche V-VI du PL – Couche II-III de l'IL constitue un circuit qui favorise l'expression de la peur, l'hyperactivation basale du PL pourrait déséquilibrer l'activité de l'IL, le tout favorisant ou prédisposant à maintenir une intensité de peur élevée ou un état d'hypervigilance qui favoriserait le maintien de l'expression de la peur (Marek et al., 2018; Mukherjee et Caroni, 2018).

2. Les animaux injectés à l'adolescence précoce présentent des symptômes typiques du PTSD à l'âge adulte

Lors des troubles émotionnels liés à la peur, nous savons que l'amygdale est le point central dans l'expression de la peur et de son exacerbation, en particulier dans le PTSD. Ce syndrome, à l'étiologie peu connue, pourrait avoir des origines neurodéveloppementales puisque de nombreux individus atteints à l'âge adulte ont subi des stress au cours de leur enfance ou adolescence. Cependant, les variabilités interindividuelles dans l'apparition du PTSD sont élevées et les mécanismes ou altérations neurobiologiques initiaux qui favorisent le PTSD ne sont pas connus. D'où la question du rôle de l'amygdale au cours du développement et les conséquences de son altération précoce sur les processus émotionnels à l'âge adulte. Notre étude a permis ainsi de mesurer ces effets (1) sans modifier directement et initialement l'activité d'autres structures, puisque le virus reste localisé sur le lieu d'injection, (2) sans modifier la totalité des structures de l'organisme, (3) de manière constitutive et (4) sans provoquer de stress préalable. Ainsi, nous avons eu pour but de mimer une hyperactivité ou hyper-réactivité latente au cours du développement, et de déterminer si cette réactivité serait centrale dans l'apparition de ces pathologies à l'âge adulte.

Les comparaisons entre animaux injectés adolescents ou adultes avec le virus contrôle ou Virus 1 (Vir1) lors de la séance d'habituation ont ainsi montré que quels que soient l'âge d'injection ou la condition virale, les animaux ne présentaient pas de différences dans l'intensité de la peur en réponse à un stimulus sonore et un contexte neutre et non connu. Ceci suggère que malgré cette hyper-réactivité amygdalienne, la détermination de la valence émotionnelle neutre de la situation est correctement établie. En revanche, les comparaisons entre Virus 1 et Virus 2 (Vir 2) montrent une intensité de peur plus élevée pour les animaux injectés à l'adolescence avec le Vir 1 par rapport aux Vir 2 uniquement. Ceci pourrait suggérer un état d'anxiété plus élevé pour les animaux du groupe Vir1, et donc un potentiel effet *off-target* de l'un des virus KD-Tsc2. Par la suite, aucune différence ne fut observée au cours des présentations des paires SC-SI de l'apprentissage conditionné, hormis une variation de la cinétique d'apprentissage entre animaux injectés à l'adolescence et à l'âge adulte, quelle que soit la condition virale (actif vs contrôle). L'acquisition d'une peur conditionnée n'est donc pas altérée et reflète une fonctionnalité intacte de l'amygdale, ce qui nous permet aussi d'exclure

l'influence possible d'un effet lésionnel de nos injections. Dans ce cas précis, nous aurions eu soit des déficits d'apprentissage, soit une intensité de peur faible en début de tâche d'extinction de peur, en raison d'un déficit de mise en mémoire de l'apprentissage, ou une cinétique d'apprentissage de l'extinction plus rapide. Nous aurions pu aussi obtenir des niveaux différentiels dans l'intensité de freezing chez nos rats injectés avec le virus actif. Par exemple, on sait que les adolescents présentent naturellement une peur plus élevée lors de l'apprentissage associatif d'une relation SC-SI (Pattwell et al., 2012). D'autre part, il est connu que l'inhibition de mTOR altère la consolidation en mémoire de la peur conditionnée (Blundell et al., 2009 ; Mac Callum et al., 2014) et une hyperactivation de cette voie dans notre situation aurait pu également provoquer des déficits dans l'acquisition de la peur ou de sa rétention. Selon nos interprétations des perturbations fonctionnelles de l'amygdale, que nous avons détaillées en partie 1 de cette discussion, une élévation de la transmission glutamatergique ou de l'excitabilité des cellules du BLA aurait pu induire une intensité de peur exagérée lors de la présentation du SC, mais ceci n'a pas été observé. En revanche, nous n'avons pas mesuré le taux de freezing suite au choc électrique pendant les intervalles inter-essais, qui pourraient nous aider à conclure en ce qui concerne une éventuelle persistance de la peur chez les animaux injectés en dehors des présentations SC-SI.

Au cours de la présentation des 5 premiers SC de l'extinction de la peur, les rats injectés à l'adolescence tardive (PN50) ont eu des taux de freezing plus élevés que ceux injectés à l'adolescence précoce (PN25), quelle que soit la condition virale, suggérant une augmentation de la rétention de la mémoire liée à l'apprentissage de la peur pour les animaux injectés à l'adolescence tardive. En revanche, les différences sont surtout observées en fin de la séance d'extinction, où les animaux injectés avec le virus actif présentent une diminution de l'intensité de peur ralentie par rapport aux animaux contrôles. Les mêmes effets sont observés chez les animaux injectés à l'adolescence avec le Virus 2. Ceci suggère une résistance à l'extinction de la peur conditionnée chez les animaux dont la voie mTOR a été perturbée quel que soit le vecteur KD-Tsc2 injecté, excluant ainsi un effet off-target des virus. C'est notamment au travers de cette extinction de peur que nous pouvons mettre en lien la perturbation de la fonctionnalité entre le BLA, le PL et l'IL, puisqu'une augmentation de l'activité du cortex prélimbique par le BLA, et une dérégulation de l'activité de l'IL par le PL pourraient favoriser le maintien de l'expression de la peur sur toute la durée de la séance d'extinction.

Au cours du test de mémoire de l'extinction, nous avons observé un retour de peur important au premier SC pour tous les groupes, qui a ensuite diminué au fil des essais. Dans la comparaison entre le pourcentage de freezing au dernier SC de l'extinction par rapport au premier SC du test de mémoire (Day 4), nous voyons que les animaux injectés avec le virus contrôle, quel que soit leur âge, présentent une élévation de 40% de l'intensité de la peur, tandis qu'elle n'est que d'environ 25% pour les animaux injectés avec le virus actif. Les niveaux de retour de peur différentiels suggèrent un processus d'extinction distinct pour ces deux groupes. En effet, le retour de peur moins ample observé pour les animaux injectés avec le virus actif (également observé chez les virus 2) suggère que les processus d'extinction n'étaient pas complets en fin d'extinction. Enfin, la mesure du pourcentage de freezing au contexte seul a montré que seuls les animaux injectés à PN25 par le virus 2 présentent des taux de freezing élevés par rapport aux animaux injectés avec le virus 1. Ceci pourrait refléter une généralisation de la peur au contexte lors de la deuxième mise en situation, suggérant que la rétention en mémoire d'un contexte sûr a été réduite pour ce groupe. Ces différences pourraient être expliquées par la localisation de l'injection virale, qui était plus largement diffuse dans l'amygdale basale pour les Vir2 par rapport aux animaux Vir1, ou d'un effet *off-target* de l'un des deux virus KD-Tsc2 sur la peur au contexte. Également, nous savons que l'hippocampe ventral régule l'excitabilité de l'amygdale au travers de ses efférences excitatrices sur les cellules pyramidales de l'amygdale basale (Bazelot et al., 2015). Il est ainsi possible, par exemple, que l'activité régulatrice de l'hippocampe sur les cellules transduites localisées dans l'amygdale basale soit différentielle pour ces animaux.

Le test du retour de peur « *renewal* » au jour 5 n'a pas montré de différences entre les conditions virales ou les âges d'injection, qu'il s'agisse de la peur au contexte seul ou de la peur associée au SC. On observe seulement un retour de peur important au contexte initial d'apprentissage pour tous les groupes par rapport au contexte d'extinction mesuré la veille, qui suppose d'une part que les animaux ont bien retenu en mémoire que ce contexte était associé à un évènement aversif, et d'autre part que l'apprentissage de l'extinction était bien contexte-spécifique.

Enfin, nous avons révélé l'apparition d'une forte généralisation de la peur au son spécifiquement chez les rats injectés avec les virus actifs à l'adolescence (PN25). Ces résultats suggèrent que les altérations de l'activité de l'amygdale au cours du développement ont induit des troubles dans la discrimination des stimuli auditifs de valence émotionnelle neutre, qui apparaissent ici seulement après un apprentissage conditionné. En effet, une généralisation de la peur à des stimulus auditifs neutres provoque généralement des réponses de peur élevées lors du jour d'habituation. Ce type de généralisation au son est à distinguer de la généralisation de la peur au contexte, qui est dépendante de la régulation par l'hippocampe de l'activité du mPFC et du BLA. Les bases neurales de la généralisation de la peur à un SC auditif restent encore peu connues (Arun Asok, Kandel, and Rayman 2019), mais des pistes ont été proposées au travers de différentes études. De manière courante, dans le but de mesurer la généralisation de la peur à un stimulus non conditionné, les chercheurs réalisent des protocoles d'apprentissage de peur conditionnée qui présentent à la fois une série d'associations SC-SI (appelé alors SC(+)) et un stimulus auditif non-apparié à un stimulus aversif (appelé SC(-)). Notre situation est différente puisqu'il ne s'agit pas ici de discriminer un stimulus aversif d'un stimulus neutre au cours de l'apprentissage, mais d'en discriminer sa valence dans le contexte initial d'apprentissage, trois jours plus tard. Ainsi la généralisation observée est appelée par les comportementalistes une « réponse conditionnée généralisée » (J. W. Rudy and Pugh 1996). Cela dit, les structures cérébrales et les projections anatomiques qui régissent le traitement de l'information aversive ou neutre ont été étudiées et caractérisées à plusieurs reprises. Tout d'abord, Rudy et Pugh en 1996 ont montré que des rats âgés de 18 jours présentent naturellement une généralisation de la peur à un stimulus non-conditionné suite à un apprentissage, contrairement à des rats testés à 28 jours, ce qui suggère que les structures qui régulent ce comportement sont encore immatures avant l'adolescence. Cependant, il a été montré que les souris adolescentes présentent naturellement une généralisation de la peur à un stimulus non conditionné au cours de l'apprentissage d'une discrimination entre SC(+)-SI et SC(-), ce qui confirme bien que cette période est marquée par un déséquilibre émotionnel pouvant se consolider à l'âge adulte en cas de stress et d'anxiété (Rudy et Pugh, 1996). Ainsi, des auteurs ont montré que la voie indirecte thalamus – cortex auditif – amygdale était essentielle pour l'apprentissage conditionné discriminatif, et que la voie directe thalamus – amygdale était plutôt impliquée dans la suppression de la peur à un stimulus auditif neutre

(Antunes et Moita, 2010). Au sein de l'amygdale ont été mis en évidence une proportion de cellules qui répondaient au SC(+), appelées « cellules spécifiques », et dans une moindre mesure d'autres cellules répondant à la fois à la présentation du SC(+) et du SC(-), ou « cellules de généralisation » (Ghosh et Chattarji, 2015). Les auteurs de cette étude ont aussi montré qu'une élévation de l'intensité du choc électrique favorise la généralisation de la peur au stimulus non conditionné, marquée par une modification de l'activité des cellules initialement « spécifiques » vers des cellules de type « généralisation », avec une augmentation globale de l'activation du nombre de cellules de généralisation par rapport aux cellules spécifiques. De plus, ces activités sont marquées par une élévation de l'expression des voies de signalisation des MAPK, essentielles à l'induction de la plasticité synaptique et qui favorisent le maintien de la généralisation de la peur. Ainsi, ceci pourrait suggérer que plus la valence émotionnelle aversive liée à l'apprentissage conditionné est forte, plus les risques de généraliser la peur sont importants, et ces mécanismes sont dépendants de la fonctionnalité des cellules du LA, qui répondent à un SC auditif non-conditionné. Enfin, d'autres auteurs ont réalisé un conditionnement Pavlovien simple avec appariements SC-IS, suivi d'un test de discrimination 24h plus tard qui consistait en la présentation du SC(+) seul et d'un stimulus sonore neutre (CS(-)). Un second groupe a également reçu l'apprentissage Pavlovien mais sans présentation du SC(+) et/ou du SC(-) 24h plus tard. Pour les deux groupes, les animaux sont replacés 30 jours plus tard dans la boîte de conditionnement dans laquelle étaient présentés le SC(+) et le SC(-). Ainsi les auteurs ont montré pour le premier groupe que la discrimination de la peur à des stimuli non conditionnés provoquent une élévation d'expression de la protéine Arc dans les couches profondes du PL et de l'amygdale dorsolatérale, tandis que la généralisation de la peur observée dans le second groupe est associée à une diminution de l'expression de la protéine Arc dans les couches moyennes de l'infralimbique, sans différences dans l'amygdale (Pollack et al., 2018). Ainsi cela suggère que l'activité des cortex prélimbique et de l'infralimbique était nécessaire dans la discrimination de sons non-conditionnés, en tout cas dans le cadre de cette étude testant cette généralisation de la peur 30 jours après l'apprentissage.

Dans notre étude, le test de généralisation de la peur a été réalisé 3 jours après l'apprentissage, et après extinction de peur et test du *renewal*. Il est ainsi possible que l'apprentissage conditionné en soi ait pu favoriser l'augmentation globale de l'activité des cellules de l'amygdale et/ou du mPFC en réponse aux stimuli, entraînant ainsi (1) des déficits d'extinction de la peur qui suggèrent une exagération de la réponse des cellules de l'amygdale au stimulus conditionné seul, et (2) une généralisation de la peur à un son non-conditionné, qui peut être dû à une hyper-réactivité des cellules de l'amygdale lors de la présentation du stimulus neutre. Ces éléments sont trouvés uniquement au test de généralisation et non à l'habituation, ce qui suggère que l'apprentissage conditionné en soi favorise la vulnérabilité à développer une généralisation de la peur chez les rats injectés par les virus actifs à l'adolescence. Aussi, le test de généralisation est précédé du test du *renewal*. Il est ainsi possible que nous ayons perturbé l'activité compétitrice des cellules engagées spécifiquement au SC et des cellules de « généralisation », le tout provoquant une élévation de l'intensité de freezing. Au niveau du circuit PL-BLA, il est possible que l'élévation de l'activité du PL dans notre cas ait favorisé l'expression de la peur au son inconnu, d'autant plus que nous avons une corrélation positive significative entre ces deux éléments, suggérant un lien fonctionnel entre l'activité basale des cellules des couches moyennes du PL avec la généralisation de la peur au son.

Au niveau des études qui portent sur le PTSD chez l'Homme, il a été montré en 2012 que la généralisation de la peur à un stimulus non conditionné et l'impossibilité de diminuer les réponses de peur face à un élément neutre participent à la symptomatologie et sont considérés comme des marqueurs diagnostiques de la maladie (Jovanovic et al., 2012). Ces symptômes apparaissant chez nos animaux altérés à l'adolescence précoce uniquement suggèrent donc que la perturbation développementale précoce de l'amygdale à elle seule est responsable de l'apparition du phénotype après apprentissage conditionné où un stimulus sonore possède une haute valence émotionnelle négative, ayant pu agir comme étant un événement « traumatique ». Concernant le phénotype observé lors de l'extinction de peur conditionnée, et contrairement à certaines études chez l'Homme qui ont montré que les individus atteints de PTSD avaient des déficits dans la rétention mnésique de l'extinction sans déficits d'acquisition, (Fenster et al., 2018, Revue ; Wicking et al., 2016), nos animaux ne présentent à priori pas de déficits dans la rétention en mémoire de l'extinction mais plutôt un retard dans son apprentissage. Les études chez l'Homme ayant montré une hypofonction globale du mPFC en

situation basale, à tâche émotionnellement neutre et lors d'un rappel du souvenir traumatique (Shin et Handwerker, 2009, revue), et en connaissant les rôles du mPFC ventromédian (vmPFC, analogue du cortex infralimbique chez le rongeur) sur la rétention en mémoire de l'extinction de peur, il est ainsi possible que la diminution de l'activité du vmPFC chez l'Homme soit responsable des déficits de la rétention mnésique de l'extinction, mais pas de son acquisition. Dans notre cas, nous n'avons pas observé de diminution de l'activité basale de l'IL, mais l'augmentation de celle du PL pourrait refléter la résistance à l'extinction, sans altérer sa rétention en mémoire puisque l'activité de l'IL n'est pas diminuée. Ceci dit, une résistance à l'extinction de peur conditionnée, particulièrement en fin de tâche a été observée chez l'Homme atteint de PTSD (Zuj et al., 2016a; Zuj et al., 2016b) qui pourrait entrer en accord avec nos observations. Les différents phénotypes comportementaux et les altérations fonctionnelles observés dans les études chez l'Homme reflètent bien la haute variabilité inter-individuelle dans le développement et la symptomatologie du PTSD. De plus, comme indiqué au cours de la partie 3 de l'introduction, les analyses IRM chez l'Homme mesurent l'activité globale du mPFC, qui ne distingue donc pas nécessairement des zones ou des couches corticales spécifiques. Cela dit, nous savons que les individus atteints de PTSD peuvent présenter une hyperactivité du cortex cingulaire antérieur dorsal, l'analogue du PL chez le rongeur (Milad et al., 2007), qui confirme bien que l'activité du mPFC peut être hyper- ou hypo-active selon les zones, en particulier celles associées au maintien en mémoire de la peur.

Ainsi, en augmentant l'activité de l'amygdale au travers des voies de signalisation nécessaires au métabolisme cérébral, au développement de l'arborisation dendritique et au maintien de l'excitabilité des cellules à des périodes critiques du développement cérébral, nous avons suffisamment impacté le développement et l'activité des microcircuits amygdaliens qui régulent l'apprentissage et l'extinction de la peur conditionnée. En potentialisant leur activité métabolique, et au vu de la mesure de l'expression c-FOS, l'amygdale ne serait pas « hyperactive » à proprement parler, mais plutôt « hyper-réactive » à l'apprentissage aversif. Ainsi, ceci induirait un déséquilibre de l'activité des structures du réseau impliqué, autant au niveau de la fonctionnalité entre le BLA et le mPFC, ou de la fonctionnalité interne de l'amygdale. En effet, les cellules transduites peuvent être moins efficacement régulées par les interneurons GABAergiques ou par les neuromodulateurs, et une excitabilité forte de ces cellules vers le CeA favoriserait l'expression de la peur. En parallèle, l'augmentation de la

transmission réciproque entre le BLA et le mPFC favoriserait le maintien de l'expression de la peur, notamment au cours de l'extinction de la peur conditionnée, et serait associée à une perturbation de l'activité du cortex infralimbique, qui peut être normalement inhibé par le PL, ou activé pour induire des réponses compensatrices. Ainsi la seule perturbation de l'activité de l'amygdale peut être responsable de l'apparition de déséquilibres d'activité entre le BLA et le mPFC. C'est ce qui a par ailleurs été observé dans les études de Saha et collaborateurs en 2017 et 2018 dans lesquelles un knock-down spécifique des synapses inhibitrices localisées dans le segment initial axonique des cellules pyramidales du BLA chez le rat ont induit une résistance à l'extinction de la peur conditionnée et ont altéré à long terme la transmission synaptique entre le BLA et le mPFC (Saha et al., 2017, 2018). Dans notre étude, modifier l'activité des cellules du BLA a donc induit des déficits comportementaux qui suggèrent une altération de la circuiterie entre le BLA et le mPFC.

De plus, nous savons que la voie mTOR est indispensable à l'acquisition et la consolidation de la peur conditionnée, et il est donc possible qu'une augmentation de la plasticité synaptique des cellules transduites engagées dans les réponses de peur ait été favorisée dès l'apprentissage SC-SI. Ainsi, une perturbation dans la compétition d'activité entre les cellules de peur, les cellules de l'extinction, ou encore les cellules engagées lors de la réponse au SC ou au son neutre serait perturbée, résultant en une généralisation de la peur à un son inconnu. Cette généralisation, observée uniquement chez les animaux altérés à l'adolescence, suggère que la perturbation des processus développementaux dans l'amygdale au cours de cette période favorise ces déséquilibres d'activité à l'âge adulte, prédisposant ainsi à l'apparition de symptômes typiques retrouvés dans le PTSD.

Ainsi, par rapport aux informations connues dans la littérature et à nos résultats obtenus, notre modèle pourrait s'interpréter comme suit :

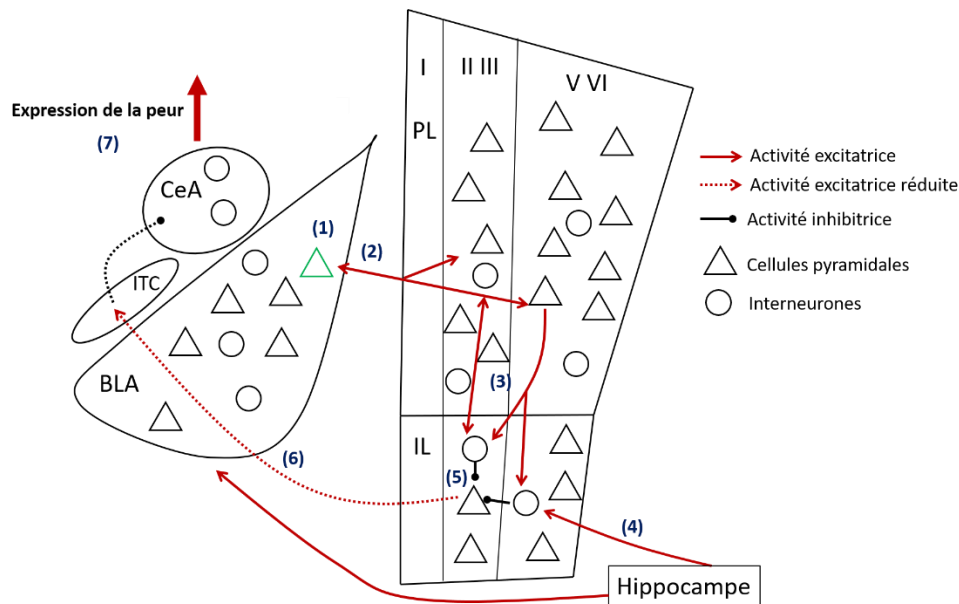


Figure 3.3 : Représentation schématique de la fonctionnalité entre l'amygdale et le cortex préfrontal dans notre modèle au travers des mesures de l'expression c-FOS basale

- (1) L'association SC-SI induit une activation des cellules pyramidales du BLA, potentiellement hyper-réactives grâce à l'activation constitutive de la voie mTOR (vert = EGFP). En parallèle elles désinhibent l'activité du CeA pour permettre l'expression de la peur (non montré)
- (2) A leur tour elles favorisent l'activité des cellules pyramidales des couches médianes et profondes du PL, et réciproquement.
- (3) Les cellules pyramidales du PL (couches II III et V VI) moduleraient l'activité du cortex infralimbique au travers des couches II III et V VI dans un sens qui reste à élucider : vers une inhibition ou une potentialisation de l'activité de l'IL ?
- (4) L'hippocampe pourrait participer à cette activité en faveur d'un maintien de l'expression de la peur au travers de son activité connue sur les interneurons PV des couches V VI de l'IL et les cellules pyramidales du BLA.
- (5) A leur tour les interneurons PV de l'IL pourraient inhiber les pyramidales présentes dans les couches II III de l'IL : l'augmentation de c-Fos dans couches III pourrait-elle être liée à l'activité GABA ?
- (6) Une diminution de la transmission de l'IL vers les ITC et le CeA est alors favorisée
- (7) L'expression de la peur est favorisée et maintenue par une diminution de l'activité du CeA vers ses voies de sortie

Il n'est pas à exclure les mécanismes de compensation qui peuvent exister dans le circuit, notamment au travers des couches médianes du PL et de l'IL, et des couches profondes du PL vers les couches médianes de l'IL. D'autres compensations peuvent exister au travers de l'activité des cellules de peur et de l'extinction du BLA ainsi que des interneurons GABAergiques du BLA qui peuvent également réguler le circuit ou maintenir l'état de peur. La fonctionnalité de l'hippocampe dans ce modèle reste hypothétique puisque son activité n'a pas été mesurée.

PL : cortex prélimbique, **IL** : cortex infralimbique, **BLA** : amygdale basolatérale ; **ITC** : cellules intercalées ; **CeA** : amygdale centrale ; **I** : couche corticale I ; **II III** : couches corticales II et III ; **V VI** : couches corticales V et VI

II. Perspectives de recherche

A. Perspectives sur la fonctionnalité des cellules transduites

Pour répondre à nos questions subsidiaires, des expériences d'électrophysiologie sur tranche de BLA d'animaux injectés à PN25, qui présentent le phénotype le plus altéré, sont envisagés pour la suite de ce projet. Ces expériences pourraient contenir deux grands axes : la fonctionnalité excitatrice et inhibitrice des cellules du BLA au travers de la mesure des potentiels de champ, ou bien la fonctionnalité des cellules transduites EGFP positives au travers d'expériences de *patch-clamp* (Sur cellule unique). Les expériences d'électrophysiologie en potentiel de champ viseraient à évaluer la fonctionnalité de la transmission excitatrice ou inhibitrice du BLA grâce à des infusions d'inhibiteurs ou de bloqueurs des récepteurs glutamatergiques ou GABAergiques. En parallèle, l'électrophysiologie en patch-clamp nous permettrait d'évaluer l'excitabilité des cellules transduites par le virus, soit au niveau basal, soit après stimulation des terminaisons axoniques qui projettent sur ces cellules. Ainsi, si une diminution de Tsc2 favorise la transmission excitatrice nous pourrions observer une diminution du seuil d'activation des potentiels d'actions, de plus fortes amplitudes de signal, des courants calciques favorisés, ou encore un ratio EPSC : IPSC en faveur d'une transmission excitatrice. Des études ont déjà montré par électrophysiologie sur des modèles de sclérose tubéreuse qu'une augmentation de la voie mTOR était responsable de l'apparition de déséquilibres dans le ratio excitation / inhibition, comme White et collaborateurs en 2001 qui ont montré à partir d'échantillons corticaux de patients malades l'apparition d'une surexpression des récepteurs glutamatergiques (GluR, NR2B)(White et al., 2001).

D'autre part, des mesures de la fonctionnalité de la voie mTOR sont envisagées et auront pour but de quantifier les protéines activées au travers de cette voie, telles que les protéines S6K et ribosomales S6, ainsi que le facteur d'initiation de la transcription 4E-BP1. Le développement des arborisations dendritiques, de la quantité d'épines dendritiques et de boutons synaptiques ou encore des vésicules de transport qui contiennent les récepteurs glutamatergiques ou GABAergiques seraient mesurées au travers d'expériences d'immunofluorescence et de biologie moléculaire. Enfin, quantifier la proportion de cellules

GABAergiques transduites qui exprimeraient TSC2 serait nécessaire afin d'élucider la question sur les potentiels effets de notre virus sur l'activité des interneurons du BLA qui pourraient co-exprimer la CamKII et Tsc2, ainsi que de leur proportion. Grâce à cela, nous pourrions conclure sur nos hypothèses de départ : Qu'une augmentation de la voie mTOR favorise la transmission excitatrice des cellules pyramidales du BLA ainsi que du développement de leur arborisation.

B. Perspectives sur l'aspect comportemental

Dans notre étude nous avons montré qu'une perturbation amygdalienne au cours du développement cérébral à l'adolescence induit un phénotype comportemental observable lorsque les animaux ont atteint l'âge adulte qui rappelle la symptomatologie du PTSD, en raison d'une dérégulation de l'activité du circuit BLA-PL-IL, le tout de manière plus importante lorsque les animaux sont altérés au cours de la phase d'adolescence précoce par rapport aux animaux altérés à la fin de l'adolescence. Ainsi il est envisagé pour un futur projet de mesurer par électrophysiologie sur animal éveillé la fonctionnalité entre le BLA et le mPFC au cours des différents jours du protocole de conditionnement de peur. Nous pourrions ainsi mieux comprendre comment l'amygdale réagit au moment de l'apprentissage, l'état de la fonctionnalité BLA-mPFC lors de l'extinction de la peur conditionnée et du test de généralisation au son. Mais également, en connaissant le caractère labile de la mémoire de l'extinction, nous aurions pu également tester le *reinstatement*: si l'apprentissage SC-SI a effectivement induit une intensité de peur élevée au SC, ce test aurait pu révéler une intensité de peur plus élevée au SC lorsque les animaux sont soumis une nouvelle fois au stimulus non-conditionné. Également, le test de *spontaneous recovery* aurait pu être réalisé, dans le but de tester la mémoire à long terme de l'extinction de la peur. L'intensité de peur étant élevée au cours de l'extinction, il est possible que l'intensité de peur mesurée au cours de ce test aurait été plus élevée.

Nos animaux injectés avec le Vir1 ou Vir2 ont présenté une peur élevée au SC auditif uniquement après l'apprentissage conditionné, sans différences à l'habituation ni au contexte d'apprentissage au jour 1 et au jour 2. Il serait ainsi probable que l'apprentissage conditionné en soi ait induit un profil anxiogène chez l'animal, tel qu'un évènement traumatique pourrait l'éliciter. Afin de savoir si une peur intense est responsable de l'apparition du phénotype observé au conditionnement de peur, une perspective serait alors d'induire un stress, aigu ou chronique avant le test de conditionnement Pavlovien. Ce test pourrait être réalisé à partir du moment où la charge virale exprimée dans l'amygdale est suffisante pour être mesurée dans les cellules, à savoir autour de 15 jours après injection. Ce délai nous est connu, puisque des animaux « tests » avaient été infusés avec l'un des trois lentivirus (contrôle, Vir1 ou Vir2), et nous avons vérifié que l'expression d'EGFP était positive 15 jours après l'injection. Ainsi, un stress appliqué à la moitié de l'adolescence des animaux injectés à PN25 (PN40) et au début de l'âge adulte (PN65) des animaux injectés à PN50, pourrait amplifier la potentialisation d'activité de l'amygdale, et induire des perturbations globales de son activité et de celle du circuit APH suffisantes pour favoriser des comportements anxieux ou renforcer les comportements observés au conditionnement de peur. Nous aurions pu également tester le niveau d'anxiété des animaux au travers d'un test du sursaut ou du test du sursaut potentialisé par la peur qui ne requièrent pas la fonctionnalité du circuit APH en soi mais dont l'état anxieux augmente les réponses de sursaut et diminue les capacités d'habituation au test du sursaut potentialisé par la peur. Enfin, le niveau de stress et d'anxiété aurait pu être évalué au travers de la mesure des taux circulants de corticostérone, qui nous renseigneraient sur la fonctionnalité du circuit hypothalamo-hypophysaire-surrénalien lors d'une perturbation amygdalienne.

D'autre part, la fonctionnalité hippocampique n'a pas été spécifiquement testée dans notre projet. Dans nos résultats obtenus dans le conditionnement de peur au son, une dysfonction hippocampique aurait pu être observée si les animaux injectés avec le virus actif avaient présenté une généralisation de la peur au contexte seul. Ceci a pu être observé pour les animaux injectés avec le virus 2 au début du test de mémoire de l'extinction (effectué dans le même contexte que l'extinction), suggérant des déficits de régulation de l'hippocampe sur l'activité des cellules du BLA pour ce groupe d'animaux. D'autres dérégulations du circuit, notamment entre l'hippocampe et le PL-IL pourraient être également présents. Ainsi, des tests

comportementaux visant à évaluer la fonctionnalité de l'hippocampe ou du cortex préfrontal pourraient être envisagés. C'est le cas notamment du conditionnement Pavlovien au contexte, dont l'apprentissage est dépendant de la fonctionnalité de l'hippocampe ventral et dorsal, ou un conditionnement de trace, qui nécessite la bonne fonctionnalité de l'hippocampe et du cortex préfrontal. D'autres tests comportementaux qui évaluent spécifiquement la fonctionnalité du mPFC, tels que le test du gambling, une tâche appétitive qui vise à évaluer la motivation, la prise de décision et l'impulsivité comportementale (Van den Bos et al., 2014), tous trois dépendants de la fonctionnalité du mPFC. Enfin, une analyse c-FOS telle que nous l'avons réalisé sur l'amygdale et le cortex préfrontal auraient été intéressants pour évaluer la fonctionnalité globale du circuit amygdale – cortex préfrontal – hippocampe.

Enfin, nous aurions pu évaluer si une infusion de rapamycine, l'inhibiteur spécifique de la protéine mTOR était capable de rétablir le phénotype obtenu au comportement de peur : en effet, inhiber la voie mTOR avant la séance d'apprentissage aurait pu participer à une diminution de l'excitabilité de l'amygdale, mais potentiellement altérer cet apprentissage ou la mise en place de sa mémoire, y compris chez les animaux contrôles. De manière similaire, une injection de rapamycine avant le test de généralisation de peur au son aurait pu nous permettre d'évaluer si l'hyper-activation de mTOR dans le BLA était bien la principale responsable de l'apparition de cette généralisation : le nouveau son étant émotionnellement neutre, une infusion de rapamycine pour les animaux contrôles avant la séance n'est pas censée provoquer d'effets différentiels dans les réponses comportementales au son, puisqu'elle altérerait seulement un apprentissage ou la rétention en mémoire. Une diminution de l'intensité de peur au cours des présentations du nouveau SC en cas d'infusion de rapamycine pour les animaux injectés à PN25 avec les virus actifs nous permettrait de conclure sur l'induction d'une hyper-réactivité amygdalienne dépendante de mTOR au cours de cette tâche.

C. Autres perspectives autour de la perturbation mTOR/Tsc2 amygdalienne

L'amygdale étant impliquée dans la détermination de la valence émotionnelle, elle l'est également pour celle de la valence appétitive et la période d'adolescence est connue pour favoriser le développement des comportements addictifs et impulsifs, qui, à l'image des troubles liés à la peur, ont tendance à s'accroître ou se maintenir à l'âge adulte. Une étude portée sur les différentiels dans la sensibilité aux addictions, telle que l'auto-administration d'eau supplémentée en sucrose chez des animaux injectés à l'adolescence et testés adultes pourrait nous dévoiler une sensibilité accrue aux éléments appétitifs et à l'apparition de troubles associés à l'addiction, de manière plus importante si les animaux sont altérés au cours de l'adolescence, comme dans notre modèle.

Il a été montré chez l'Homme et l'animal que l'implication de l'amygdale dans les processus comportementaux liés à la peur est latéralisée et sexe-spécifique. En effet, des études d'imagerie par IRM et PET Scan ont montré que l'amygdale droite serait plutôt impliquée dans l'expression de la peur au moment du rappel de présentation d'images aversives chez l'homme, et concerne l'amygdale gauche chez la femme (Cahill et al., 2001, 2004). Chez le rat mâle, il a été montré au travers de la mesure de l'activité Arc que le traitement des valences appétitives était corrélé avec l'activité de l'amygdale gauche tandis que l'amygdale droite était activée après un protocole de conditionnement de peur Pavlovien (Young et Williams, 2013). Une seconde étude d'IRM chez le rat mâle adulte éveillé, au moment de la présentation d'un CS visuel 24h après l'apprentissage a montré que l'amygdale droite était activée, tandis qu'un autre groupe d'animaux également adultes mais stressés au stade juvénile ont présenté une activation bilatérale de l'amygdale (Brydges et al., 2013). Plusieurs autres études ont aussi démontré, uniquement chez les mâles, que l'amygdale droite était effectivement activée en réponse à des éléments aversifs, après apprentissage conditionné, et au moment de son rappel, puisqu'une lésion de l'amygdale droite après apprentissage perturbe l'expression de peur au moment du rappel (Baker et Kim, 2004). Dans notre modèle, certains animaux présentent une diffusion virale plus importante en fonction de l'amygdale, en raison des variabilités inter-individuelles au moment de l'injection. Les corrélations entre le comportement de peur et la densité virale en fonction de la latéralité n'ont pas été testées dans notre modèle, mais

constitueraient une perspective de recherche pour approfondir nos résultats. De plus, sur la base des connaissances des différences en fonction du genre dans les fonctions cérébrales, la latéralisation de la fonctionnalité amygdalienne, et les comportements en situation de stress, une étude de l'hyperactivation développementale de l'amygdale et de ses conséquences sur le comportement émotionnel chez le rat femelle serait bienvenue, d'autant plus que la prévalence du PTSD est plus forte chez la femme (10-12 % des femmes) que chez l'homme (5-6 % des hommes) (Olf, 2017).

Pour finir, même si les mécanismes initiaux qui favorisent le développement du PTSD sont peu connus, nous savons déjà qu'un stress juvénile ou adolescent favorise l'apparition de ce PTSD, mais qu'il concerne vraisemblablement un déséquilibre affectant de nombreuses structures cérébrales engagées dans la gestion émotionnelle. Ainsi les individus qui présentent déjà des niveaux d'anxiété élevée en lien avec des stress ou traumatismes au cours de leur enfance pourraient être prédisposés à développer un PTSD après un choc psychologique, au contraire des processus de résilience, dont les individus concernés, même après avoir vécu des stress ou des traumatismes juvéniles, ne développent pas de troubles émotionnels à l'âge adulte. A l'heure actuelle des traitements médicamenteux sont proposés et testés, et le candidat principal dans le traitement du PTSD serait la kétamine, un antagoniste des récepteurs glutamatergiques qui diminue l'excitabilité globale du SNC et est notamment employé comme anesthésiant. Ses mécanismes d'action sont connus, puisqu'au niveau du système nerveux central la kétamine diminue l'excitabilité des voies entre le thalamus, le néocortex et les structures limbiques, et diminue donc l'excitabilité des voies impliquées dans le maintien de l'expression de la peur, de l'anxiété ou de l'hypervigilance (Liriano et al., 2019; P. White et al., 1982). La kétamine semble être aujourd'hui le traitement le plus prometteur pour le PTSD, mais elle présente tout de même un haut potentiel addictif et provoque un état de sédation qui résulte en une diminution des fonctions cognitives, motrices et mnésiques. D'autres cibles thérapeutiques visant spécifiquement à diminuer l'excitabilité de l'amygdale après un traumatisme ou un stress intense au moment du développement pourraient être envisagées dans de futures recherches.

CONCLUSION GENERALE

Au travers de la modification développementale de l'activité de l'amygdale, appliquée au début ou à la fin de l'adolescence du rat mâle, nous avons pu observer à l'âge adulte des altérations du comportement de peur différentiel selon l'âge auquel la perturbation a été appliquée. Alors que les animaux altérés à la fin de l'adolescence présentent uniquement des déficits d'extinction de peur conditionnée, les animaux altérés à 25 jours post-natal présentent en plus à l'âge adulte une généralisation de la peur à un son inconnu, associé à une perturbation de la fonctionnalité du circuit entre l'amygdale, le cortex prélimbique et le cortex infralimbique dans le sens d'une activité qui favorise ou prolonge l'expression de la peur. L'altération amygdalienne induite à l'adolescence précoce impacte spécifiquement les processus de maturation apparaissant dans l'amygdale et dans le développement de ses projections vers le cortex préfrontal. Ainsi, nous avons probablement favorisé l'excitabilité globale des cellules excitatrices constituant l'amygdale basolatérale et le développement de ses projections vers le cortex prélimbique. Ce modèle pourrait ainsi aider à identifier les mécanismes qui sous-tendent l'émergence du syndrome de stress-post traumatique. Il est ainsi possible qu'une hyper-réactivité latente et développementale de l'amygdale, apparaissant particulièrement au cours de l'adolescence, soit à elle seule responsable d'une dérégulation de l'activité du circuit APH, tandis que le traumatisme vécu à l'âge adulte serait l'élément déclencheur qui mettrait en lumière le déséquilibre déjà présent.

Enfin, la modulation de l'activité de Tsc2/mTOR au cours du développement pourrait, tout comme les modèles animaux préexistants, induire des déficits dans le comportement social et dévoiler des symptômes associés à ceux du spectre autistique. Alors que les mécanismes qui sous-tendent le développement des troubles autistiques ainsi que les structures cérébrales impliquées sont de plus en plus dévoilées, il existe de nombreuses théories sur les raisons de cette apparition (déficits dans l'élagage synaptique, déséquilibre de la transmission glutamatergique/GABAergique dans les structures corticales). En connaissant ses rôles dans le comportement émotionnel et à la reconnaissance de la valence émotionnelle, une dérégulation de l'activité de l'amygdale est également au cœur de certaines théories sur l'autisme (Ashwin et al., 2006; Baron-Cohen et al., 2000) puisqu'il a été observé chez certains individus atteints d'autisme une augmentation ou une diminution de son volume, associé ou non à une hyper-

activité en réponse à des stimuli (Herrington et al. 2016, 2017; Tottenham et al. 2014). De plus, il a été montré chez l'Homme que l'amygdale présentait des modifications de la connectivité entre ses noyaux pouvant aller – dans la même amygdale – de l'hyper à l'hypo connectivité selon les noyaux (Kleinhans et al. 2016). D'autres ont également observé une désorganisation des connectivités au sein des noyaux amygdaliens et entre l'amygdale et les structures corticales (Gibbard et al. 2018). Au niveau du comportement émotionnel et cognitif, les patients échoueraient à discriminer la valence émotionnelle des stimuli sociaux, à reconnaître et à percevoir l'expression des émotions et à décoder le « langage social », tout comme Kling en 1974 qui a mis en évidence les rôles psychosociaux du lobe temporal et de l'amygdale chez le singe. De plus, les modèles Tsc2 se portent principalement sur les symptômes liés au syndrome du spectre autistique qui touche la majorité des individus atteints de sclérose tubéreuse en raison des modifications des connectivités au sein des structures et entre les structures cérébrales et de la morphologie cellulaire. Ainsi, l'étude d'une modification de l'activité de l'amygdale par la voie Tsc2/mTOR au cours du développement juvénile, adolescent ou adulte et ses effets sur le comportement social et l'apparition de symptômes autistiques pourraient constituer un nouveau projet de recherche, afin de savoir si l'amygdale à elle seule pourrait être responsable de l'apparition de certains symptômes relatifs au syndrome du spectre autistique.

RÉFÉRENCES

- Adriani, Walter, Simone Macrí, Roberta Pacifici, and Giovanni Laviola. 2002. "Peculiar Vulnerability to Nicotine Oral Self-Administration in Mice during Early Adolescence." *Neuropsychopharmacology* 27(2): 212–24.
- Afifi, Tracie O., Gordon J.G. Asmundson, Steven Taylor, and Kerry L. Jang. 2010. "The Role of Genes and Environment on Trauma Exposure and Posttraumatic Stress Disorder Symptoms: A Review of Twin Studies." *Clinical Psychology Review* 30(1): 101–12.
- Aggleton, JP. 2000. *The Amygdala, Vol. 2*. Oxford Uni.
- Amano, Taiju, Sevil Duvarci, Daniela Popa, and Denis Paré. 2011. "The Fear Circuit Revisited: Contributions of the Basal Amygdala Nuclei to Conditioned Fear." *Journal of Neuroscience* 31(43): 15481–89.
- Amorapanth, P., J. E. LeDoux, and K. Nader. 2000. "Different Lateral Amygdala Outputs Mediate Reactions and Actions Elicited by a Fear-Arousing Stimulus." *Nature Neuroscience* 3(1): 74–79.
- Andersen, Susan L. 2003. "Trajectories of Brain Development: Point of Vulnerability or Window of Opportunity?" *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27(1–2): 3–18.
- Andersen, Susan L., and Martin H. Teicher. 2008. "Stress, Sensitive Periods and Maturational Events in Adolescent Depression." *Trends in Neurosciences* 31(4): 183–91.
- Anderson, David J., and Ralph Adolphs. 2015. "A Framework for Studying Emotions Across Phylogeny." *Cell* 157(1): 187–200.
- Antunes, Raquel, and Marta A. Moita. 2010. "Discriminative Auditory Fear Learning Requires Both Tuned and Nontuned Auditory Pathways to the Amygdala." *Journal of Neuroscience* 30(29): 9782–87.
- Arnold, Magdalena B. 1960. I and II *Emotion and Personality*. University. New York, Columbia: University Press.
- Arnold, Steven E., and John Q. Trojanowski. 1996. "Human Fetal Hippocampal Development: I. Cytoarchitecture, Myeloarchitecture, and Neuronal Morphologic Features." *Journal of Comparative Neurology* 367(2): 274–92.
- Arruda-Carvalho, Maithe, Wan Chen Wu, Kirstie A. Cummings, and Roger L. Clem. 2017. "Optogenetic Examination of Prefrontal-Amygdala Synaptic Development." *Journal of Neuroscience* 37(11): 2976–85.
- Ascoli, Giorgio, Lidia Lonso-Nanclares, Stewart Anderson, and Et Al. 2008. "Petilla Terminology: Nomenclature of Features of GABAergic Interneurons of the Cerebral Cortex." *Nature Reviews Neuroscience* 23(7): 557–68.
- Ashwin, Chris, Emma Chapman, Livia Colle, and Simon Baron-Cohen. 2006. "Impaired Recognition of Negative Basic Emotions in Autism: A Test of the Amygdala Theory." *Social*

neuroscience 1(3–4): 349–63.

- Asok, A., E. Kandel, and J. Rayman. 2019. "The Neurobiology of Fear Generalization." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12.
- Asok, Arun, Eric R. Kandel, and Joseph B. Rayman. 2019. "The Neurobiology of Fear Generalization." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 12(January): 1–15.
- Atwoli, Lukoye, Dan J. Stein, Karestan C. Koenen, and Katie A. McLaughlin. 2015. "Epidemiology of Posttraumatic Stress Disorder: Prevalence, Correlates and Consequences." *Current Opinion in Psychiatry* 28(4): 307–11.
- Avital, Avi, and Gal Richter-Levin. 2005. "Exposure to Juvenile Stress Exacerbates the Behavioural Consequences of Exposure to Stress in the Adult Rat." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 8(2): 163–73.
- Awad, Walaa, Guillaume Ferreira, and Mouna Maroun. 2015. "Dissociation of the Role of Infralimbic Cortex in Learning and Consolidation of Extinction of Recent and Remote Aversion Memory." *Neuropsychopharmacology* 40(11): 2566–75. <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2015.103>.
- Bacon, Sarah J., Anthony J.N. Headlam, Paul L.A. Gabbott, and A. David Smith. 1996. "Amygdala Input to Medial Prefrontal Cortex (MPFC) in the Rat: A Light and Electron Microscope Study." *Brain Research* 720(1–2): 211–19.
- Baker, Kathryn D., Miriam L. Den, Bronwyn M. Graham, and Rick Richardson. 2014. "A Window of Vulnerability: Impaired Fear Extinction in Adolescence." *Neurobiology of Learning and Memory* 113: 90–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2013.10.009>.
- Baker, Kathryn D., and Rick Richardson. 2015. "Forming Competing Fear Learning and Extinction Memories in Adolescence Makes Fear Difficult to Inhibit." *Learning and Memory* 22(11): 537–43.
- Baker, Kevin B., and Jeansok J. Kim. 2004. "Amygdalar Lateralization in Fear Conditioning: Evidence for Greater Involvement of the Right Amygdala." *Behavioral Neuroscience* 118(1): 15–23.
- Bale, Tracy et al. 2010. "Early Life Programming and Neurodevelopmental Disorders." *Biological Psychiatry* 68(4): 314–19.
- Balogun, Olukunmi et al. 2014. "Alcohol Consumption and Psychological Distress in Adolescents: A Multi-Country Study." *Journal of Adolescent Health* 54(2): 228–34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jadohealth.2013.07.034>.
- Bandeira, Fabiana, Roberto Lent, and Suzana Herculano-Houzel. 2009. "Changing Numbers of Neuronal and Non-Neuronal Cells Underlie Postnatal Brain Growth in the Rat." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(33): 14108–13.
- Barha, Cindy K., Susanne Brummelte, Stephanie E. Lieblich, and Liisa A.M. Galea. 2011. "Chronic Restraint Stress in Adolescence Differentially Influences Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Function and Adult Hippocampal Neurogenesis in Male and Female Rats."

Hippocampus 21(11): 1216–27.

- Barnet, Robert C., and Pamela S. Hunt. 2005. "Trace and Long-Delay Fear Conditioning in the Developing Rat." *Learning and Behavior* 33(4): 437–43.
- Baron-Cohen, S. et al. 2000. "The Amygdala Theory of Autism." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24(3): 355–64.
- Bateup, Helen S. et al. 2011. "Loss of Tsc1 in Vivo Impairs Hippocampal mGluR-LTD and Increases Excitatory Synaptic Function." *Journal of Neuroscience* 31(24): 8862–69.
- Baudry, Michel. 1981. "Development of Glutamate Binding Sites and Their Regulation by Calcium in Rat Hippocampus." *Developmental Brain Research* (1): 37–48.
- Bazelot, Michaël et al. 2015. "Hippocampal Theta Input to the Amygdala Shapes Feedforward Inhibition to Gate Heterosynaptic Plasticity." *Neuron* 87(6): 1290–1303.
- Benes, Francine. 1994. "Myelination of a Key Relay Zone in the Hippocampal Formation Occurs in the Human Brain During Childhood, Adolescence, and Adulthood." *Arch Gen Psychiatry* 51: 477–84.
- Benson, D. L., P. J. Isackson, C. M. Gall, and E. G. Jones. 1992. "Contrasting Patterns in the Localization of Glutamic Acid Decarboxylase and Ca²⁺ /Calmodulin Protein Kinase Gene Expression in the Rat Central Nervous System." *Neuroscience* 46(4): 825–49.
- Berdel, Bożena, and Janusz Moryś. 2000. "Expression of Calbindin-D28k and Parvalbumin during Development of Rat's Basolateral Amygdaloid Complex." *International Journal of Developmental Neuroscience* 18(6): 501–13.
- Van Den Berg, C. L. et al. 1999. "Play Is Indispensable for an Adequate Development of Coping with Social Challenges in the Rat." *Developmental Psychobiology* 34(2): 129–38.
- Bergstrom, Hadley C., Craig G. McDonald, and Luke R. Johnson. 2011. "Pavlovian Fear Conditioning Activates a Common Pattern of Neurons in the Lateral Amygdala of Individual Brains." *PLoS ONE* 6(1).
- Berry, Martin et al. 2016. "Prospects for mTOR-Mediated Functional Repair after Central Nervous System Trauma." *Neurobiology of Disease* 85: 99–110.
- Bhutta, Adnan T., and K. J.S. Anand. 2002. "Vulnerability of the Developing Brain: Neuronal Mechanisms." *Clinics in Perinatology* 29(3): 357–72.
- Bick, Johanna, and Charles A. Nelson. 2016. "Early Adverse Experiences and the Developing Brain." *Neuropsychopharmacology* 41(1): 177–96.
- Blanchard, D. Caroline, and Robert J. Blanchard. 1972. "Innate and Conditioned Reactions to Threat in Rats with Amygdaloid Lesions." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 81(2): 281–90.
- Blanchard, Robert J., and D. Caroline Blanchard. 1969. "Crouching as an Index of Fear." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 67(3): 370–75.
- Bloodgood, Daniel W., Jonathan A. Sugam, Andrew Holmes, and Thomas L. Kash. 2018. "Fear Extinction Requires Infralimbic Cortex Projections to the Basolateral Amygdala."

Translational Psychiatry 8(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-018-0106-x>.

- Blundell, Jacqueline, Mehreen Kouser, and Craig Powell. 2008. "Systemic Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin Inhibits Fear Memory Reconsolidation." *Neurobiology of Learning and Memory* 23(90): 28–35.
- Van den Bos, Ruud, Susanne Koot, and Leonie De Visser. 2014. "A Rodent Version of the Iowa Gambling Task: 7 Years of Progress." *Frontiers in Psychology* 5(MAR): 1–6.
- Bosch, Daniel, and Ingrid Ehrlich. 2015. "Postnatal Maturation of GABAergic Modulation of Sensory Inputs onto Lateral Amygdala Principal Neurons." *Journal of Physiology* 593(19): 4387–4409.
- Bouton, Mark E., and Sean T. Ricker. 1994. "Renewal of Extinguished Responding in a Second Context." *Animal Learning & Behavior* 22(3): 317–24.
- Bouton, Mark E., R. Frederick Westbrook, Kevin A. Corcoran, and Stephen Maren. 2006. "Contextual and Temporal Modulation of Extinction: Behavioral and Biological Mechanisms." *Biological Psychiatry* 60(4): 352–60.
- Bouton ME. 2002. "Context, Ambiguity, and Unlearning: Sources of Relapse after Behavioral Extinction." *Biological Psychiatry* 52(10): 976–86.
- Bouwmeester, H., G. Wolterink, and J. M. Van Ree. 2002. "Neonatal Development of Projections from the Basolateral Amygdala to Prefrontal, Striatal, and Thalamic Structures in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 442(3): 239–49.
- Bouwmeester, Hans, Kim Smits, and Jan M. Van Ree. 2002. "Neonatal Development of Projections to the Basolateral Amygdala from Prefrontal and Thalamic Structures in Rat." *Journal of Comparative Neurology* 450(3): 241–55.
- Brady, Kathleen T., and Rajita Sinha. 2005. "Co-Occurring Mental and Substance Use Disorders: The Neurobiological Effects of Chronic Stress." *American Journal of Psychiatry* 162(8): 1483–93.
- Bremner, J. Douglas et al. 2005. "Positron Emission Tomographic Imaging of Neural Correlates of a Fear Acquisition and Extinction Paradigm in Women with Childhood Sexual-Abuse-Related Post-Traumatic Stress Disorder." *Psychological Medicine* 35(6): 791–806.
- Bremner, J. Douglas, Bernet Elzinga, Christian Schmahl, and Eric Vermetten. 2007. "Structural and Functional Plasticity of the Human Brain in Posttraumatic Stress Disorder." *Progress in Brain Research* 167(Did): 171–86.
- Brodal, Alf. 1947. "The Amygdaloid Nucleus in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 87(1): 1–16.
- Brooks, Douglas C., and Mark E. Bouton. 1993. "A Retrieval Cue for Extinction Attenuates Spontaneous Recovery." *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 19(1): 77–89.
- Brown, Sarah M., Shannon Henning, and Cara L. Wellman. 2005. "Mild, Short-Term Stress Alters Dendritic Morphology in Rat Medial Prefrontal Cortex." *Cerebral Cortex* 15(11): 1714–22.

- Brunetti, M. et al. 2010. "Elevated Response of Human Amygdala to Neutral Stimuli in Mild Post Traumatic Stress Disorder: Neural Correlates of Generalized Emotional Response." *Neuroscience* 168(3): 670–79.
- Brydges, Nichola M. et al. 2013. "Imaging Conditioned Fear Circuitry Using Awake Rodent FMRI." *PLoS ONE* 8(1): 4–10.
- Brydges, Nichola M. et al. 2014. "Juvenile Stress Enhances Anxiety and Alters Corticosteroid Receptor Expression in Adulthood." *Brain and Behavior* 4(1): 4–13.
- Burgos-Robles, Anthony, Ivan Vidal-Gonzalez, and Gregory J. Quirk. 2009. "Sustained Conditioned Responses in Prelimbic Prefrontal Neurons Are Correlated with Fear Expression and Extinction Failure." *Journal of Neuroscience* 29(26): 8474–82.
- Buss, Robert R., Woong Sun, and Ronald W. Oppenheim. 2006. "Adaptive Roles of Programmed Cell Death during Nervous System Development." *Annual Review of Neuroscience* 29: 1–35.
- Busti, Daniela et al. 2011. "Different Fear States Engage Distinct Networks within the Intercalated Cell Clusters of the Amygdala." *Journal of Neuroscience* 31(13): 5131–44.
- Butler, Ryan K. et al. 2017. "Distinct Neuronal Populations in the Basolateral and Central Amygdala Are Activated with Acute Pain, Conditioned Fear, and Fear-Conditioned Analgesia." *Neuroscience Letters* 661: 11–17.
- Caballero, Adriana, Daniel R. Thomases, et al. 2014. "Emergence of GABAergic-Dependent Regulation of Input-Specific Plasticity in the Adult Rat Prefrontal Cortex during Adolescence." *Psychopharmacology* 231(8): 1789–96.
- Caballero, Adriana, Eden Flores-Barrera, Daryn K. Cass, and Kuei Y. Tseng. 2014. "Differential Regulation of Parvalbumin and Calretinin Interneurons in the Prefrontal Cortex during Adolescence." *Brain Structure and Function* 219(1): 395–406.
- Cahill, Larry et al. 2001. "Sex-Related Difference in Amygdala Activity during Emotionally Influenced Memory Storage." *Neurobiology of Learning and Memory* 75(1): 1–9.
- Cahill, Larry et al. 2004. "Sex-Related Hemispheric Lateralization of Amygdala Function in Emotionally Influenced Memory: An FMRI Investigation." *Learning and Memory* 11(3): 261–66.
- Callaghan, Bridget L., and Nim Tottenham. 2016. "The Stress Acceleration Hypothesis: Effects of Early-Life Adversity on Emotion Circuits and Behavior." *Current Opinion in Behavioral Sciences* 7: 76–81.
- Canteras, N. S., and L. W. Swanson. 1992. "Projections of the Ventral Subiculum to the Amygdala, Septum, and Hypothalamus: A PHAL Anterograde Tract-tracing Study in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 324(2): 180–94.
- Carnicella, Sebastien. 2015. "Intermittent Ethanol Access Schedule in Rats as a Preclinical Model of Alcohol Abuse." 48(3): 243–52.
- Casey, B. J., Stéphanie Duhoux, and Matthew Malter Cohen. 2010. "Adolescence: What Do Transmission, Transition, and Translation Have to Do with It?" *Neuron* 67(5): 749–60.

- Casey, B. J., Nim Tottenham, Conor Liston, and Sarah Durston. 2005. "Imaging the Developing Brain: What Have We Learned about Cognitive Development?" *Trends in Cognitive Sciences* 9(3 SPEC. ISS.): 104–10.
- Cassell, M. D., and D. J. Wright. 1986. "Topography of Projections from the Medial Prefrontal Cortex to the Amygdala in the Rat." *Brain Research Bulletin* 17(3): 321–33.
- Caviness, Verne S. 1975. "Architectonic Map of Neocortex of the Normal Mouse." *Journal of Comparative Neurology* 164(2): 247–63.
- Cepeda, Carlos et al. 2003. "Morphological and Electrophysiological Characterization of Abnormal Cell Types in Pediatric Cortical Dysplasia." *Journal of Neuroscience Research* 72(4): 472–86.
- Chaaya, Nicholas, Andrew R. Battle, and Luke R. Johnson. 2018. "An Update on Contextual Fear Memory Mechanisms: Transition between Amygdala and Hippocampus." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 92(May 2017): 43–54.
- Chaby, Lauren E., Heather C. Lasseter, Charles Geier, and Andreas Jeromin. 2020. "Determining Effects of Adolescent Stress Exposure on Risk for Posttraumatic Stress Disorder in Adulthood." *Current Opinion in Behavioral Sciences* 36: 79–89.
- Chang, Chun hui, and Stephen Maren. 2010. "Strain Difference in the Effect of Infralimbic Cortex Lesions on Fear Extinction in Rats." *Behavioral Neuroscience* 124(3): 391–97.
- Chang, Chun Hui, and Stephen Maren. 2011. "Medial Prefrontal Cortex Activation Facilitates Re-Extinction of Fear in Rats." *Learning and Memory* 18(4): 221–25.
- Chen, Veronica, Allison Foilb, and John Christianson. 2016. "Inactivation of Ventral Hippocampus Interfered with Cued-Fear Acquisition but Did Not Influence Later Recall or Discrimination." *Behavior Brain Res* 296: 249–53.
- Chini, Mattia, and Ileana L. Hanganu-Opatz. 2020. "Prefrontal Cortex Development in Health and Disease: Lessons from Rodents and Humans." *Trends in Neurosciences* xx(xx): 1–14.
- Choi, Yong Jin et al. 2008. "Tuberous Sclerosis Complex Proteins Control Axon Formation." *Genes and Development* 22(18): 2485–95.
- Choudhury, Mayukh et al. 2020. "Inhibition of MTOR during a Postnatal Critical Sensitive Window Rescues Deficits in GABAergic PV Cell Connectivity and Social Behavior Caused by Loss of TSC1." : 1–39.
- Chung, Yong An et al. 2006. "Alterations in Cerebral Perfusion in Posttraumatic Stress Disorder Patients without Re-Exposure to Accident-Related Stimuli." *Clinical Neurophysiology* 117(3): 637–42.
- Cisler, J. M. et al. 2016. "Changes in Functional Connectivity of the Amygdala during Cognitive Reappraisal Predict Symptom Reduction during Trauma-Focused Cognitive-Behavioral Therapy among Adolescent Girls with Post-Traumatic Stress Disorder." *Psychological Medicine* 46(14): 3013–23.
- Clancy, B., R. B. Darlington, and B. L. Finlay. 2001. "Translating Developmental Time across Mammalian Species." *Neuroscience* 105(1): 7–17.

- Cloitre, Marylene et al. 2009. "A Developmental Approach to Complex PTSD: Childhood and Adult Cumulative Trauma as Predictors of Symptom Complexity." *Journal of traumatic stress* 22: 399–408.
- Cohen, Hagit et al. 2006. "Blunted HPA Axis Response to Stress Influences Susceptibility to Posttraumatic Stress Response in Rats." *Biological Psychiatry* 59(12): 1208–18.
- Cohen, Matthew Malter et al. 2013. "Early-Life Stress Has Persistent Effects on Amygdala Function and Development in Mice and Humans." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(45): 18274–78.
- Concina, Giulia, Marco Cambiaghi, Annamaria Renna, and Benedetto Sacchetti. 2018. "Coherent Activity between the Prelimbic and Auditory Cortex in the Slow-Gamma Band Underlies Fear Discrimination." *Journal of Neuroscience* 38(39): 8313–28.
- Conger, J, and A Petersen. 1984. *Psychology in the Schools Adolescence and Youth: Psychological Development in a Changing World*. New York : New york.
- Cook, Susan C., and Cara L. Wellman. 2004. "Chronic Stress Alters Dendritic Morphology in Rat Medial Prefrontal Cortex." *Journal of Neurobiology* 60(2): 236–48.
- Corcoran, Kevin A., and Stephen Maren. 2001. "Hippocampal Inactivation Disrupts Contextual Retrieval of Fear Memory after Extinction." *Journal of Neuroscience* 21(5): 1720–26.
- Corcoran, Kevin A., and Gregory J. Quirk. 2007. "Activity in Prelimbic Cortex Is Necessary for the Expression of Learned, but Not Innate, Fears." *Journal of Neuroscience* 27(4): 840–44.
- Costa-Mattioli, Mauro, and Lisa M. Monteggia. 2013. "mTOR Complexes in Neurodevelopmental and Neuropsychiatric Disorders." *Nature Neuroscience* 16(11): 1199–1209.
- Costello, E. Jane et al. 2003. "Prevalence and Development of Psychiatric Disorders in Childhood and Adolescence. Archives of General Psychiatry: 60, 837-844." *Arch Gen Psychiatry* 60(8): 837–844.
- Coyle, JT, and J Enna. 1976. "NEUROCHEMICAL ASPECTS OF THE ONTOGENESIS OF GABANERGIC NEURONS IN THE RAT BRAIN." *Brain Research* 111: 119–33.
- Crain, Barbara, Carl Cotman, Dwan Taylor, and Gary Lynch. 1973. "A Quantitative Electron Microscopic Study of Synaptogenesis in the Dentate Gyrus of the Rat." *Brain Research* 63(C): 195–204.
- Cressman, Victoria L., Jordan Balaban, Sara Steinfeld, Alexei Shemyakin, Peter Graham, et al. 2010. "Prefrontal Cortical Inputs to the Basal Amygdala Undergo Pruning during Late Adolescence in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 518(14): 2693–2709.
- Cressman, Victoria L, Jordan Balaban, Sara Steinfeld, Alexei Shemyakin, Nelly Parisot, et al. 2010. "Pruning During Late Adolescence in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 518(14): 2693–2709.
- Cunningham, Miles Gregory, Sujoy Bhattacharyya, and Francine Mary Benes. 2002a. "Amygdalo-Cortical Sprouting Continues into Early Adulthood: Implications for the Development of Normal and Abnormal Function during Adolescence." *Journal of Comparative Neurology* 453(2): 116–30.

- Cunningham, Miles Gregory, Sujoy Bhattacharyya, and Francine Mary Benes. 2002b. "Amygdalo-Cortical Sprouting Continues into Early Adulthood: Implications for the Development of Normal and Abnormal Function during Adolescence." *Journal of Comparative Neurology* 453(2): 116–30.
- Curatolo, Paolo, Romina Moavero, and Petrus J. de Vries. 2015. "Neurological and Neuropsychiatric Aspects of Tuberous Sclerosis Complex." *The Lancet Neurology* 14(7): 733–45.
- Dahl, Ronald E. 2004. "Adolescent Brain Development: A Period of Vulnerabilities and Opportunities." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1021(2): 1–22.
- Darwin, Charles. 1872. "L'expression Des Émotions Chez l'Homme et Chez Les Animaux."
- Davis, Michael. 2000. 2 *The Role of the Amygdala in Conditioned and Unconditioned Fear and Anxiety*. In: Aggleton JP (Ed.). *The Amygdala, Vol. 2*. Oxford Uni. Oxford.
- DeFelipe, Javier, and Isabel Fariñas. 1992. "The Pyramidal Neuron of the Cerebral Cortex: Morphological and Chemical Characteristics of the Synaptic Inputs." *Progress in Neurobiology* 39(6): 563–607.
- Djordjevic, Jelena, Ana Djordjevic, Miroslav Adzic, and Marija B. Radojicic. 2012. "Effects of Chronic Social Isolation on Wistar Rat Behavior and Brain Plasticity Markers." *Neuropsychobiology* 66(2): 112–19.
- Do-Monte, Fabricio H. et al. 2015. "Revisiting the Role of Infralimbic Cortex in Fear Extinction with Optogenetics." *Journal of Neuroscience* 35(8): 3607–15.
- Doron, Guy, and Kobi Rosenblum. 2010. "C-Fos Expression Is Elevated in GABAergic Interneurons of the Gustatory Cortex Following Novel Taste Learning." *Neurobiology of Learning and Memory* 94(1): 21–29.
- Dreyfuss, Michael et al. 2014. "Teens Impulsively React Rather than Retreat from Threat." *Developmental Neuroscience* 36(0): 220–27.
- Duvarci, Sevil, and Denis Paré. 2007. "Glucocorticoids Enhance the Excitability of Principal Basolateral Amygdala Neurons." *Journal of Neuroscience* 27(16): 4482–91.
- van Eden, C. G., and H. B.M. Uylings. 1985. "Cytoarchitectonic Development of the Prefrontal Cortex in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 241(3): 253–67.
- Ehninger, Dan et al. 2008. "Reversal of Learning Deficits in a Tsc2+/- Mouse Model of Tuberous Sclerosis." 14(8): 843–48.
- Ehrlich, David E. et al. 2013. "Postnatal Maturation of GABAergic Transmission in the Rat Basolateral Amygdala." *Journal of Neurophysiology* 110(4): 926–41.
- Ehrlich, Ingrid et al. 2009. "Amygdala Inhibitory Circuits and the Control of Fear Memory." *Neuron* 62(6): 757–71.
- Ekman, Paul, and Wallace Friesen. 1986. "A New Pan Cultural Facial Expression of Emotion." *Motivation and emotion* 10(2): 159–68.
- Esclassan, Frederic, Etienne Coutureau, Georges Di Scala, and Alain R. Marchand. 2009.

- "Differential Contribution of Dorsal and Ventral Hippocampus to Trace and Delay Fear Conditioning." *Hippocampus* 19(1): 33–44.
- Fearing, Franklin, I. P. Pavlov, and G. V. Anrep. 1929. "Conditioned Reflexes. An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex." *Journal of the American Institute of Criminal Law and Criminology* 20(1): 153.
- Felix-Ortiz, Ada C. et al. 2013. "BLA to VHPC Inputs Modulate Anxiety-Related Behaviors." *Neuron* 79(4): 658–64.
- Fenster, Robert J., Lauren A.M. Lebois, Kerry J. Ressler, and Junghyup Suh. 2018. "Brain Circuit Dysfunction in Post-Traumatic Stress Disorder: From Mouse to Man." *Nature Reviews Neuroscience* 19(9): 535–51.
- Ferreira, Ashley N., Hanna Yousuf, Sarah Dalton, and Patrick L. Sheets. 2015. "Highly Differentiated Cellular and Circuit Properties of Infralimbic Pyramidal Neurons Projecting to the Periaqueductal Gray and Amygdala." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9(APR): 1–15.
- Flores-Barrera, Eden et al. 2014. "Late Adolescent Expression of GluN2B Transmission in the Prefrontal Cortex Is Input-Specific and Requires Postsynaptic Protein Kinase A and D1 Dopamine Receptor Signaling." *Biological Psychiatry* 75(6): 508–16.
- Frijda, Nico H. 1995. "Emotions and Emotion Words." *Everyday Conceptions of Emotion*: 121–43.
- Fusar-Poli, P. et al. 2011. "Neuroanatomy of Vulnerability to Psychosis: A Voxel-Based Meta-Analysis." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35(5): 1175–85.
- Gabbott, P. L.A., T. A. Warner, and S. J. Busby. 2006. "Amygdala Input Monosynaptically Innervates Parvalbumin Immunoreactive Local Circuit Neurons in Rat Medial Prefrontal Cortex." *Neuroscience* 139(3): 1039–48.
- Gabbott, Paul L.A. et al. 2005. "Prefrontal Cortex in the Rat: Projections to Subcortical Autonomic, Motor, and Limbic Centers." *Journal of Comparative Neurology* 492(2): 145–77.
- Gatto, Cheryl L., and Kendal Broadie. 2010. "Genetic Controls Balancing Excitatory and Inhibitory Synaptogenesis in Neurodevelopmental Disorder Models." *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 2(JUN): 1–19.
- Gazzaley, Adam, Nancy Weiland, Bruce McEwen, and John Morrison. 1996. "Differential Regulation of NMDAR1 mRNA and Protein by Estradiol in the Rat Hippocampus Adam." *Journal of Neuroscience* 16(21): 6830–38.
- Gee, Dylan G. et al. 2013. "A Developmental Shift from Positive to Negative Connectivity in Human Amygdala-Prefrontal Circuitry." *Journal of Neuroscience* 33(10): 4584–93.
- Geschwind, Norman. 1965. "Disconnexion Syndromes in Animals and Man: Part I." *Neuropsychology Review* 20(2): 128–57.
- Ghosh, Supriya, and Sumantra Chattarji. 2015. "Neuronal Encoding of the Switch from Specific to Generalized Fear." *Nature Neuroscience* 18(1): 112–20.

- Gibbard, Clare R. et al. 2018. "Structural Connectivity of the Amygdala in Young Adults with Autism Spectrum Disorder." *Human Brain Mapping* 39(3): 1270–82.
- Gilmartin, Marieke R., and Fred J. Helmstetter. 2010. "Trace and Contextual Fear Conditioning Require Neural Activity and NMDA Receptor-Dependent Transmission in the Medial Prefrontal Cortex." *Learning and Memory* 17(6): 289–96.
- Girotti, M. et al. 2006. "Habituation to Repeated Restraint Stress Is Associated with Lack of Stress-Induced c-Fos Expression in Primary Sensory Processing Areas of the Rat Brain." *Neuroscience* 138(4): 1067–81.
- Goddard, Graham V. 1964. "Amygdaloid Stimulation and Learning in the Rat." *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 58(1): 23–30.
- Goddings, Anne Lise et al. 2014. "The Influence of Puberty on Subcortical Brain Development." *NeuroImage* 88: 242–51.
- Goswami, Sonal, Olga Rodríguez-Sierra, Michele Cascardi, and Denis Paré. 2013. "Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder: Face Validity." *Frontiers in Neuroscience* 7(7 MAY): 1–14.
- Govindan, Rajkumar Munian et al. 2010. "Altered Water Diffusivity in Cortical Association Tracts in Children with Early Deprivation Identified with Tract-Based Spatial Statistics (TBSS)." *Cerebral Cortex* 20(3): 561–69.
- Graber, J. A., and J. Brooks-Gunn. 1996. "Expectations for and Precursors to Leaving Home in Young Women." *New directions for child development* (71): 21–38.
- Guyer, Amanda E et al. 2009. "Amygdala and Ventrolateral Prefrontal Cortex Function During Anticipated Peer Evaluation in Pediatric Social Anxiety." *Arch Gen Psychiatry* 65(11): 1303–12.
- Hamezah, Hamizah Shahirah et al. 2017. "Volumetric Changes in the Aging Rat Brain and Its Impact on Cognitive and Locomotor Functions." *Experimental Gerontology* 99(April): 69–79.
- Han, Jin Hee et al. 2007. "Neuronal Competition and Selection during Memory Formation." *Science* 316(5823): 457–60.
- Han, Xiao et al. 2011. "Brief Social Isolation in Early Adolescence Affects Reversal Learning and Forebrain BDNF Expression in Adult Rats." *Brain Research Bulletin* 86(3–4): 173–78.
- Hare, Todd A et al. 2008. "Biological Substrates of Emotional Reactivity and Regulation in Adolescence during an Emotional Go-NoGo Task." *Biol Psychiatry* 63(19): 927–34.
- Harlow, John M. 1850. "Recovery from the Passage of an Iron Bar through the Head." *American journal of medical sciences* 20: 13–22.
- Harris, Glenn C., and Jon E. Levine. 2003. "Pubertal Acceleration of Pulsatile Gonadotropin-Releasing Hormone Release in Male Rats as Revealed by Microdialysis." *Endocrinology* 144(1): 163–71.
- Haruvi-Lamdan, Nirit et al. 2020. "Autism Spectrum Disorder and Post-Traumatic Stress

- Disorder: An Unexplored Co-Occurrence of Conditions." *Autism* 24(4): 884–98.
- Hefner, Kathryn, and Andrew Holmes. 2007. "Ontogeny of Fear-, Anxiety- and Depression-Related Behavior across Adolescence in C57BL/6J Mice." *Behavioural Brain Research* 176(2): 210–15.
- Helmstetter, Fred J. 1992. "The Amygdala Is Essential for the Expression of Conditional Hypoalgesia." *Behavioral Neuroscience* 106(3): 518–28.
- Hendler, Talma et al. 2003. "Sensing the Invisible: Differential Sensitivity of Visual Cortex and Amygdala to Traumatic Context." *NeuroImage* 19(3): 587–600.
- Henigsberg, Neven, Petra Kalember, Zrnka Kovačić Petrović, and Ana Šečić. 2019. "Neuroimaging Research in Posttraumatic Stress Disorder – Focus on Amygdala, Hippocampus and Prefrontal Cortex." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 90(June 2018): 37–42.
- Herbert, Martha R. 2010. "Contributions of the Environment and Environmentally Vulnerable Physiology to Autism Spectrum Disorders." *Current Opinion in Neurology* 23(2): 103–10.
- Hermans, Erno J. et al. 2014. "How the Amygdala Affects Emotional Memory by Altering Brain Network Properties." *Neurobiology of Learning and Memory* 112: 2–16.
- Herrington, John D. et al. 2017. "Amygdala Volume Differences in Autism Spectrum Disorder Are Related to Anxiety." *Journal of Autism and Developmental Disorders* 47(12): 3682–91.
- Herrington, John D., Judith S. Miller, Juhi Pandey, and Robert T. Schultz. 2016. "Anxiety and Social Deficits Have Distinct Relationships with Amygdala Function in Autism Spectrum Disorder." *Social Cognitive and Affective Neuroscience* 11(6): 907–14.
- Herry, Cyril et al. 2008. "Switching on and off Fear by Distinct Neuronal Circuits." *Nature* 454(7204): 600–606.
- Hirai, Yasuharu, Mieko Morishima, Fuyuki Karube, and Yasuo Kawaguchi. 2012. "Specialized Cortical Subnetworks Differentially Connect Frontal Cortex to Parahippocampal Areas." *Journal of Neuroscience* 32(5): 1898–1913.
- Hobin, Jennifer A., Jinzhao Ji, and Stephen Maren. 2006. "Ventral Hippocampal Muscimol Disrupts Context-Specific Fear Memory Retrieval after Extinction in Rats." *Hippocampus* 16(2): 174–82.
- Hoefler, Charles A., and Eric Klann. 2010. "mTOR Signaling: At the Crossroads of Plasticity, Memory and Disease." *Trends in Neurosciences* 33(2): 67–75.
- Hoover, Walter B., and Robert P. Vertes. 2007. "Anatomical Analysis of Afferent Projections to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat." *Brain Structure and Function* 212(2): 149–79.
- Horii-Hayashi, N. et al. 2013. "Developmental Changes in Desensitisation of C-Fos Expression Induced by Repeated Maternal Separation in Pre-Weaned Mice." *Journal of Neuroendocrinology* 25(2): 158–67.
- Huang, Chiung Chun, Chien Chung Chen, Ying Ching Liang, and Kuei Sen Hsu. 2014. "Long-Term Potentiation at Excitatory Synaptic Inputs to the Intercalated Cell Masses of the

- Amygdala." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 17(8): 1233–42.
- Huang, Wen Chin, Youjun Chen, and Damon T. Page. 2016. "Hyperconnectivity of Prefrontal Cortex to Amygdala Projections in a Mouse Model of Macrocephaly/Autism Syndrome." *Nature Communications* 7: 1–15.
- Hunt, Pamela S. 1999. "A Further Investigation of the Developmental Emergence of Fear-Potentiated Startle in Rats." *Developmental Psychobiology* 34(4): 281–91.
- Hunt, Pamela S., and Rick Richardson. 2007. "Pharmacological Dissociation of Trace and Long-Delay Fear Conditioning in Young Rats." *Neurobiology of Learning and Memory* 87(1): 86–92.
- Huttenlocher, P R. 1979. "Synaptic Density in Human Frontal Cortex - Developmental Changes and Effects of Aging." *Brain Research* 163(2): 195–205.
- Hwang, Soonjo et al. 2014. "Neurodevelopmental Changes in the Responsiveness of Systems Involved in Top down Attention and Emotional Responding." *Neuropsychologia* 62: 277–85.
- Ignácio, Zuleide M. et al. 2016. "New Perspectives on the Involvement of MTOR in Depression as Well as in the Action of Antidepressant Drugs." *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1280–90.
- Isgor, Ceylan, Mohamed Kabbaj, Huda Akil, and Stanley J. Watson. 2004. "Delayed Effects of Chronic Variable Stress during Peripubertal-Juvenile Period on Hippocampal Morphology and on Cognitive and Stress Axis Functions in Rats." *Hippocampus* 14(5): 636–48.
- Izaki, Yoshinori, Masatoshi Takita, and Tatsuo Akema. 2003. "Compatibility of Bidirectional Synaptic Plasticity on Hippocampo-Prefrontal Cortex Pathway in Rats." *Neuroscience Letters* 345(1): 69–71.
- Izquierdo, Alicia, Cara L. Wellman, and Andrew Holmes. 2006. "Brief Uncontrollable Stress Causes Dendritic Retraction in Infralimbic Cortex and Resistance to Fear Extinction in Mice." *Journal of Neuroscience* 26(21): 5733–38.
- Jacobson-Pick, Shlomit et al. 2008. "Juvenile Stress-Induced Alteration of Maturation of the GABAA Receptor α Subunit in the Rat." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 11(7): 891–903.
- Jacobson, Stanley. 1963. "Sequence of Myelination in the Brain of the Albino Rat. Cerebral Cortex, Thalamus and Related Structures."
- Jacques, Angela et al. 2018. "Functional Neuronal Topography: A Statistical Approach to Micro Mapping Neuronal Location." *Frontiers in Neural Circuits* 12(October): 1–14.
- Jacques, Angela et al.. 2019. "Microtopography of Fear Memory Consolidation and Extinction Retrieval within Prefrontal Cortex and Amygdala." *Psychopharmacology* 236(1): 383–97.
- Jantzie, Lauren L. et al. 2015. "Developmental Expression of N-Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptor Subunits in Human White and Gray Matter: Potential Mechanism of Increased Vulnerability in the Immature Brain." *Cerebral Cortex* 25(2): 482–95.

- Jaworski, Jacek, and Morgan Sheng. 2006. "The Growing Role of MTOR in Neuronal Development and Plasticity." *Molecular Neurobiology* 34(3): 205–19.
- Jensen, Frances E. 2002. "The Role of Glutamate Receptor Maturation in Perinatal Seizures and Brain Injury." *International Journal of Developmental Neuroscience* 20(3–5): 339–47.
- Ji, Guangchen, and Volker Neugebauer. 2012. "Modulation of Medial Prefrontal Cortical Activity Using in Vivo Recordings and Optogenetics." *Molecular brain* 5: 1–10.
- Johansen, Joshua P., Christopher K. Cain, Linnaea E. Ostroff, and Joseph E. Ledoux. 2011. "Molecular Mechanisms of Fear Learning and Memory." *Cell* 147(3): 509–24.
- Johnson, Frances K. et al. 2018. "Amygdala Hyper-Connectivity in a Mouse Model of Unpredictable Early Life Stress." *Translational Psychiatry* 8(1).
- Jovanovic, Tanja, Andrew Kazama, Jocelyne Bachevalier, and Michael Davis. 2012. "Impaired Safety Signal Learning May Be a Biomarker of PTSD." *Neuropharmacology* 62(2): 695–704.
- Ju, Xianshu et al. 2020. "The MTOR Inhibitor Rapamycin Prevents General Anesthesia-Induced Changes in Synaptic Transmission and Mitochondrial Respiration in Late Postnatal Mice." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 14(January): 1–10.
- Juraska, Janice M., Cheryl L. Sisk, and Lydia L. DonCarlos. 2013. "Sexual Differentiation of the Adolescent Rodent Brain: Hormonal Influences and Developmental Mechanisms." *Hormones and Behavior* 64(2): 203–10.
- Kaiser, R. H. et al. 2018. "Childhood Stress, Grown-up Brain Networks: Corticolimbic Correlates of Threat-Related Early Life Stress and Adult Stress Response." *Psychological Medicine* 48(7): 1157–66.
- Karst, Henk et al. 2002. "Glucocorticoids Alter Calcium Conductances and Calcium Channel Subunit Expression in Basolateral Amygdala Neurons." *European Journal of Neuroscience* 16(6): 1083–89.
- Kawaguchi, Yasuo, and Yoshiyuki Kubota. 1997. "GABAergic Cell Subtypes and Their Synaptic Connections in Rat Frontal Cortex." *Cerebral Cortex* 7(6): 476–86.
- Van Kerkhof, Linda Wm et al. 2013. "Social Play Behavior in Adolescent Rats Is Mediated by Functional Activity in Medial Prefrontal Cortex and Striatum." *Neuropsychopharmacology* 38(10): 1899–1909.
- Khazipov, Roustem et al. 2001. "Early Development of Neuronal Activity in the Primate Hippocampus in Utero." *Journal of Neuroscience* 21(24): 9770–81.
- Khazipov, Roustem et al. 2015. "Atlas of the Postnatal Rat Brain in Stereotaxic Coordinates." *Frontiers in Neuroanatomy* 9(DEC): 1–5.
- Kim-Cohen, Julia et al. 2003. "Prior Juvenile Diagnoses in Adults With Mental Disorder." *Archives of General Psychiatry* 60(7): 709.
- Kim, Jeansok J., Robert E. Clark, and Richard F. Thompson. 1995. "Hippocampectomy Impairs the Memory of Recently, but Not Remotely, Acquired Trace Eyeblink Conditioned Responses." *Behavioral Neuroscience* 109(2): 195–203.

- Kim, Jee Hyun, Stella Li, and Rick Richardson. 2011. "Immunohistochemical Analyses of Long-Term Extinction of Conditioned Fear in Adolescent Rats." *Cerebral Cortex* 21(3): 530–38.
- Kim, Sung il. 2013. "Neuroscientific Model of Motivational Process." *Frontiers in Psychology* 4(MAR): 1–12.
- Kleinhans, Natalia M. et al. 2016. "Subregional Differences in Intrinsic Amygdala Hyperconnectivity and Hypoconnectivity in Autism Spectrum Disorder." *Autism Research* 9(7): 760–72.
- Kling, Arthur. 1974. "Differential Effects of amygdectomy in Male and Female Non human primates". (2): 129–34.
- Klüver, Heinrich, and Paul C. Bucy. 1939. "Preliminary Analysis of Functions of the Temporal Lobes in Monkeys." *Archives of Neurology And Psychiatry* 42(6): 979–1000.
- Knapska, Ewelina, and Stephen Maren. 2009. "Reciprocal Patterns of C-Fos Expression in the Medial Prefrontal Cortex Amygdala." (734): 486–93.
- Koehl, Muriel et al. 2020. "Inhibition of MTOR Signaling by Genetic Removal of P70 S6 Kinase 1 Leads to Anxiety-like Disorders."
- Kolb, Bryan et al. 2012. "Experience and the Developing Prefrontal Cortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(SUPPL.2): 17186–96.
- Konstantoudaki, Anthippi et al. 2018. "Prefrontal Cortical-Specific Differences in Behavior and Synaptic Plasticity between Adolescent and Adult Mice." *Journal of Neurophysiology* 119(3): 822–33.
- Koolhaas, J. M. et al. 2011. "Stress Revisited: A Critical Evaluation of the Stress Concept." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35(5): 1291–1301.
- Kornack, David R., and Pasko Rakic. 1999. "Continuation of Neurogenesis in the Hippocampus of the Adult Macaque Monkey." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(10): 5768–73.
- Krabbe, Sabine, Jan Gründemann, and Andreas Lüthi. 2018. "Amygdala Inhibitory Circuits Regulate Associative Fear Conditioning." *Biological Psychiatry* 83(10): 800–809.
- Krettek, J. E., and J. L. Price. 1977. "The Cortical Projections of the Mediodorsal Nucleus and Adjacent Thalamic Nuclei in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 171(2): 157–91.
- Krettek, J. E., and J. L. Price.. 1978. "A Description of the Amygdaloid Complex in the Rat and Cat with Observations on Intra-amygdaloid Axonal Connections." *Journal of Comparative Neurology* 178(2): 255–79.
- Kriebel, Martin et al. 2011. "The Cell Adhesion Molecule Neurofascin Stabilizes Axo-Axonic GABAergic Terminals at the Axon Initial Segment." *Journal of Biological Chemistry* 286(27): 24385–93.
- Kriebel, Martin et al.. 2020. "Interference With Complex IV as a Model of Age-Related Decline in Synaptic Connectivity." *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13(March): 1–14.
- Langton, Julia M., Jee Hyun Kim, Jennifer Nicholas, and Rick Richardson. 2007. "The Effect of

- the NMDA Receptor Antagonist MK-801 on the Acquisition and Extinction of Learned Fear in the Developing Rat." *Learning and Memory* 16(3): 161–66.
- Langton, Julia M., and Rick Richardson. 2010. "The Effect of D-Cycloserine on Immediate vs. Delayed Extinction of Learned Fear." *Learning and Memory* 17(11): 547–51.
- Laroche, Serge, Thérèse M. Jay, and Anne Marie Thierry. 1990. "Long-Term Potentiation in the Prefrontal Cortex Following Stimulation of the Hippocampal CA1/Subicular Region." *Neuroscience Letters* 114(2): 184–90.
- LeDoux, J. E., J. Iwata, P. Cicchetti, and D. J. Reis. 1988. "Different Projections of the Central Amygdaloid Nucleus Mediate Autonomic and Behavioral Correlates of Conditioned Fear." *Journal of Neuroscience* 8(7): 2517–29.
- Ledoux, Joseph E. 1996. *The Emotional Brain*.
- Ledoux, Joseph E, and Joseph E Ledoux. 2000. "EMOTION CIRCUITS IN THE BRAIN." *New York*: 155–84.
- Lee, Paul R., Dana Brady, and James I. Koenig. 2003. "Corticosterone Alters N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunit mRNA Expression before Puberty." *Molecular Brain Research* 115(1): 55–62.
- Lee, Richard S., Lynn M. Oswald, and Gary S. Wand. 2018. "Early Life Stress as a Predictor of Co-Occurring Alcohol Use Disorder and Post-Traumatic Stress Disorder." *Alcohol Research: Current Reviews* 39(2): 147–59.
- Leslie, Frances M. et al. 2004. "Adolescent Development of Forebrain Stimulant Responsiveness: Insights from Animal Studies." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1021: 148–59.
- Li, Yong, Michael N. Corradetti, Ken Inoki, and Kun Liang Guan. 2004. "TSC2: Filling the GAP in the MTOR Signaling Pathway." *Trends in Biochemical Sciences* 29(1): 32–38.
- Lieberman, Lisa C., Ottmar V. Lipp, Susan H. Spence, and Sonja March. 2006. "Evidence for Retarded Extinction of Aversive Learning in Anxious Children." *Behaviour Research and Therapy* 44(10): 1491–1502.
- Liberzon, Israel et al. 1999. "Brain Activation in PTSD in Response to Trauma-Related Stimuli." *Biological Psychiatry* 45(7): 817–26.
- Liberzon, Israel, and Chandra Sekhar Sripada. 2007. "The Functional Neuroanatomy of PTSD: A Critical Review." *Progress in Brain Research* 167(07): 151–69.
- Likhtik, Ekaterina, Joe Guillaume Pelletier, Rony Paz, and Denis Paré. 2005. "Prefrontal Control of the Amygdala." *Journal of Neuroscience* 25(32): 7429–37.
- Liriano, Felix, Candace Hatten, and Thomas L. Schwartz. 2019. "Ketamine as Treatment for Post-Traumatic Stress Disorder: A Review." *Drugs in Context* 8: 1–7.
- Little, Justin P., and Adam G. Carter. 2012. "Subcellular Synaptic Connectivity of Layer 2 Pyramidal Neurons in the Medial Prefrontal Cortex." *Journal of Neuroscience* 32(37): 12808–19.

- Little, Justin P., and Adam G. Carter. 2013. "Synaptic Mechanisms Underlying Strong Reciprocal Connectivity between the Medial Prefrontal Cortex and Basolateral Amygdala." *Journal of Neuroscience* 33(39): 15333–42.
- Liu, Xingchen, and Adam G. Carter. 2018. "Ventral Hippocampal Inputs Preferentially Drive Corticocortical Neurons in the Infralimbic Prefrontal Cortex." *Journal of Neuroscience* 38(33): 7351–63.
- Loonen, A. J.M., and S. A. Ivanova. 2016. "Circuits Regulating Pleasure and Happiness in Major Depression." *Medical Hypotheses* 87: 14–21.
- Lugarà, Eleonora et al. 2019. "Synapsin I Controls Synaptic Maturation of Long-Range Projections in the Lateral Amygdala in a Targeted Selective Fashion." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13(May): 1–14.
- Lukkes, Jodi L., Maxim V. Mokin, Jamie L. Scholl, and Gina L. Forster. 2009. "Adult Rats Exposed to Early-Life Social Isolation Exhibit Increased Anxiety and Conditioned Fear Behavior, and Altered Hormonal Stress Responses." *Hormones and Behavior* 55(1): 248–56.
- Maclean, Paul D. 1949. "Psychosomatic Disease and the 'Visceral Brain.'" *Psychosomatic Medicine* 11(6): 338–53.
- Magalhães, R. et al. 2018. "The Dynamics of Stress: A Longitudinal MRI Study of Rat Brain Structure and Connectome." *Molecular Psychiatry* 23(10): 1998–2006.
- Malik, Anna R. et al. 2013. "Beyond Control of Protein Translation: What We Have Learned about the Non-Canonical Regulation and Function of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)." *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1834(7): 1434–48.
- Malter Cohen, M., N. Tottenham, and B. J. Casey. 2013. "Translational Developmental Studies of Stress on Brain and Behavior: Implications for Adolescent Mental Health and Illness?" *Neuroscience* 249: 53–62.
- Marek, R., L. Xu, R. Sullivan, and P. Sah. 2018. "Excitatory Connections between the Prelimbic and Infralimbic Medial Prefrontal Cortex Show a Role for the Prelimbic Cortex in Fear Extinction." *Nature Neuroscience* 21(5).
- Marek, Roger, Jingji Jin, et al. 2018. "Hippocampus-Driven Feed-Forward Inhibition of the Prefrontal Cortex Mediates Relapse of Extinguished Fear." *Nature Neuroscience* 21(3): 384–92.
- Marek, Roger, Li Xu, Robert K.P. Sullivan, and Pankaj Sah. 2018. "Excitatory Connections between the Prelimbic and Infralimbic Medial Prefrontal Cortex Show a Role for the Prelimbic Cortex in Fear Extinction." *Nature Neuroscience* 21(5): 654–58.
- Maren, Caitlin A. Orsini¹ and Stephen. 2008. "Neural and Cellular Mechanisms of Fear and Extinction Memory Formation." *Bone* 23(1): 1–7.
- Maren, Stephen, Gal Aharonov, and Michael S. Fanselow. 1996. "Retrograde Abolition of Conditional Fear after Excitotoxic Lesions in the Basolateral Amygdala of Rats: Absence of a Temporal Gradient." *Behavioral Neuroscience* 110(4): 718–26.
- Maren, Stephen, and Michael S. Fanselow. 1995. "Synaptic Plasticity in the Basolateral

- Amygdala Induced by Hippocampal Formation Stimulation in Vivo." *Journal of Neuroscience* 15(11): 7548–64.
- Maren, Stephen, and Gregory J. Quirk. 2004. "Neuronal Signalling of Fear Memory." *Nature Reviews Neuroscience* 5(11): 844–52.
- Margarinos, Ana Maria, José M. Garcia Verdugo, and Bruce S Mcewen. 1997. "Chronic Stress Alters Synaptic Terminal Structure in Hippocampus." *Proceedings of the National Academy of Sciences Neurobiology* 94(December): 14002–8.
- Maroun, Mouna, and Gal Richter-Levin. 2003. "Exposure to Acute Stress Blocks the Induction of Long-Term Potentiation of the Amygdala-Prefrontal Cortex Pathway in Vivo." *Journal of Neuroscience* 23(11): 4406–9.
- Marowsky, Anne, Jean Marc Fritschy, and Kaspar E. Vogt. 2004. "Functional Mapping of GABAA Receptor Subtypes in the Amygdala." *European Journal of Neuroscience* 20(5): 1281–89.
- Márquez, C. et al. 2013. "Peripuberty Stress Leads to Abnormal Aggression, Altered Amygdala and Orbitofrontal Reactivity and Increased Prefrontal MAOA Gene Expression." *Translational psychiatry* 3(July 2012).
- Maslova, L. N., V. V. Bulygina, and A. L. Markel. 2002. "Chronic Stress during Prepubertal Development: Immediate and Long-Lasting Effects on Arterial Blood Pressure and Anxiety-Related Behavior." *Psychoneuroendocrinology* 27(5): 549–61.
- Maslova, Larissa N., Veta V. Bulygina, and Nina K. Popova. 2002. "Immediate and Long-Lasting Effects of Chronic Stress in the Prepubertal Age on the Startle Reflex." *Physiology and Behavior* 75(1–2): 217–25.
- Matsumoto, D., and Paul Ekman. 2009. "Basic Emotions. In D. Sander and K.R Scherer (Eds.)." *Oxford Companion to Emotion and the Affective Sciences*. Oxford University Press.: 2009.
- Mcardle, Eliza T et al. 1996. "Relationship of Childhood Anxiety Correlates and Influence to Adult Panic on Course Disorder:" *American Journal of Psychiatry* 153(March): 376–81.
- McCallum, Jessica, Jee Hyun Kim, and Rick Richardson. 2010. "Impaired Extinction Retention in Adolescent Rats: Effects of d-Cycloserine." *Neuropsychopharmacology* 35(10): 2134–42.
- McCormick, Cheryl M., and Iva Z. Mathews. 2007. "HPA Function in Adolescence: Role of Sex Hormones in Its Regulation and the Enduring Consequences of Exposure to Stressors." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 86(2): 220–33.
- McCormick, Cheryl M., Iva Z. Mathews, Catherine Thomas, and Patti Waters. 2010. "Investigations of HPA Function and the Enduring Consequences of Stressors in Adolescence in Animal Models." *Brain and Cognition* 72(1): 73–85.
- Mcdonald, A. J. 1991. "Organization of Amygdaloid Projections to the Prefrontal Cortex and Associated Striatum in the Rat." *Neuroscience* 44(1): 1–14.
- Mcdonald, Alexander J. 1998. "Cortical Pathways to the Mammalian Amygdala." *Progress in Neurobiology* 55(3): 257–332.
- McDonald, Alexander J. 1982. "Cytoarchitecture of the Central Amygdaloid Nucleus of the Rat."

- Journal of Comparative Neurology* 208(4): 401–18.
- McDonald, Alexander J. 1984. "Neuronal Organization of the Lateral and Basolateral Amygdaloid Nuclei in the Rat." *Journal of Comparative Neurology* 222(4): 589–606.
- McDonald, Alexander J, Franco Mascagni, and L Guo. 1996. "Projections of the Medial and Lateral Prefrontal Cortices to the Amygdala." *Science*.
- McEwen, Bruce S. 1999. "Stress and Hippocampal Plasticity." *Annual Review of Neuroscience* 22: 105–22.
- McEwen, Bruce S. 2017. "Neurobiological and Systemic Effects of Chronic Stress." *Chronic Stress* 1: 247054701769232.
- McEwen, Bruce S., Carla Nasca, and Jason D. Gray. 2016. "Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex." *Neuropsychopharmacology* 41(1): 3–23
- McKernan, M. G., and P. Shinnick-Gallagher. 1997. "Fear Conditioning Induces a Lasting Potentiation of Synaptic Currents in Vitro." *Nature* 390(6660): 607–11.
- McMahon, John J. et al. 2015. "Seizure-Dependent MTOR Activation in 5-HT Neurons Promotes Autism-like Behaviors in Mice." *Neurobiology of Disease* 73: 296–306.
- Michael RR. 2017. "Analysis of Synapsin I and II MRNAs and Proteins During Murine Development." *Molecular Biology* 06(03).
- Milad, M. R., I. Vidal-Gonzalez, and G. J. Quirk. 2004. "Electrical Stimulation of Medial Prefrontal Cortex Reduces Conditioned Fear in a Temporally Specific Manner." *Behavioral Neuroscience* 118(2): 389–94.
- Milad, Mohammed R. et al. 2007. "A Role for the Human Dorsal Anterior Cingulate Cortex in Fear Expression." *Biological Psychiatry* 62(10): 1191–94.
- Milad, Mohammed R., and Gregory J. Quirk. 2002. "Neurons in Medial Prefrontal Cortex Signal Memory for Fear Extinction." *Nature* 420(6911): 70–74.
- Miller, Earl K, and Jonathan D Cohen. 2001. "An Integrate Theory of PFC Function." *Annual Review of Neuroscience* 24: 167–202.
- Mills, Kathryn L. et al. 2014. "The Developmental Mismatch in Structural Brain Maturation during Adolescence." *Developmental Neuroscience* 36(3–4): 147–60.
- Mitra, Rupshi et al. 2005. "Stress Duration Modulates the Spatiotemporal Patterns of Spine Formation in the Basolateral Amygdala." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(26): 9371–76.
- Moench, Kelly M., Mouna Maroun, Alexandra Kavushansky, and Cara Wellman. 2016. "Alterations in Neuronal Morphology in Infralimbic Cortex Predict Resistance to Fear Extinction Following Acute Stress." *Neurobiology of Stress* 3: 23–33.
- Mohanty, Aprajita et al. 2007. "Differential Engagement of Anterior Cingulate Cortex Subdivisions for Cognitive and Emotional Function." *Psychophysiology* 44(3): 343–51.
- Monk, Christopher S. et al. 2008. "Amygdala and Ventrolateral Prefrontal Cortex Activation to

- Masked Angry Faces in Children and Adolescents with Generalized Anxiety Disorder." *Archives of General Psychiatry* 65(5): 568–76.
- Morawska, Marta M., and Markus Fendt. 2012. "The Effects of Muscimol and AMN082 Injections into the Medial Prefrontal Cortex on the Expression and Extinction of Conditioned Fear in Mice." *Journal of Experimental Biology* 215(8): 1394–98.
- Morey, Rajendra A. et al. 2012. "Amygdala Volume Changes in Posttraumatic Stress Disorder in a Large Case-Controlled Veterans Group." *Archives of General Psychiatry* 69(11): 1169–78.
- Morgan, Maria A., Lizabeth M. Romanski, and Joseph E. LeDoux. 1993. "Extinction of Emotional Learning: Contribution of Medial Prefrontal Cortex." *Neuroscience Letters* 163(1): 109–13.
- Moriceau, Stephanie, and Regina M. Sullivan. 2006. "Maternal Presence Serves as a Switch between Learning Fear and Attraction in Infancy." *Nature Neuroscience* 9(8): 1004–6.
- Morterá, Priscilla, and Suzana Herculano-Houzel. 2012. "Age-Related Neuronal Loss in the Rat Brain Starts at the End of Adolescence." *Frontiers in Neuroanatomy* 6(OCTOBER 2012): 1–9.
- Moser, May Britt et al. 1995. "Spatial Learning with a Minislab in the Dorsal Hippocampus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(21): 9697–9701.
- Mukherjee, Arghya, and Pico Caroni. 2018. "Infralimbic Cortex Is Required for Learning Alternatives to Prelimbic Promoted Associations through Reciprocal Connectivity." *Nature Communications* 9(1).
- Myers, K. M., and M. Davis. 2007. "Mechanisms of Fear Extinction." *Molecular Psychiatry* 12(2): 120–50.
- Nader, Karim, Glenn E. Schafe, and Joseph E. Le Doux. 2000. "Fear Memories Require Protein Synthesis in the Amygdala for Reconsolidation after Retrieval." *Nature* 406(6797): 722–26.
- Neves, Laura Tartari et al. 2019. "Increases in Dendritic Spine Density in BLA without Metabolic Changes in a Rodent Model of PTSD." *Brain Structure and Function* 224(8): 2857–70.
- Nitecka, L., and Y. Ben-Ari. 1987. "Distribution of GABA-like Immunoreactivity in the Rat Amygdaloid Complex." *Journal of Comparative Neurology* 266(1): 45–55.
- Nugent, Nicole R, Ananda Amstadter, and Karestan C Koenen. 2008. "Genetics of Post-Traumatic Stress Disorder: Informing Clinical Conceptualizations and Promoting Future Research." *American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics* 148C(2): 127–32.
- De Oca, Beatrice M., Joseph P. DeCola, Stephen Maren, and Michael S. Fanselow. 1998. "Distinct Regions of the Periaqueductal Gray Are Involved in the Acquisition and Expression of Defensive Responses." *Journal of Neuroscience* 18(9): 3426–32.
- Olf, Miranda. 2017. "Sex and Gender Differences in Post-Traumatic Stress Disorder: An Update." *European Journal of Psychotraumatology* 8(1): 1–2.
- Orsini, Caitlin A., Jee Hyun Kim, Ewelina Knapska, and Stephen Maren. 2011. "Hippocampal and

- Prefrontal Projections to the Basal Amygdala Mediate Contextual Regulation of Fear after Extinction." *Journal of Neuroscience* 31(47): 17269–77.
- Ortony, Andrew, and Terence J. Turner. 1990. "What's Basic about Basic Emotions?" *Psychological Review* 97(3): 315–31.
- Otsuka, Takeshi, and Yasuo Kawaguchi. 2011. "Cell Diversity and Connection Specificity between Callosal Projection Neurons in the Frontal Cortex." *Journal of Neuroscience* 31(10): 3862–70.
- Ouimet, C. C., T. L. McGuinness, and P. Greengard. 1984. "Immunocytochemical Localization of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Rat Brain." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(17 I): 5604–8.
- Pagani, Marco et al. 2020. "A Cross-species Link between MTOR-related Synaptic Pathology and Functional Hyperconnectivity in Autism." *bioRxiv*.
- Pan, Bing Xing, Wataru Ito, and Alexei Morozov. 2009. "Divergence Between Thalamic and Cortical Inputs to Lateral Amygdala During Juvenile-Adult Transition in Mice." *Biological Psychiatry* 66(10): 964–71.
- Panksepp, Jaak. 1981. "The Ontogeny of Play in Rats." *Developmental Psychobiology* 14(4): 327–32.
- Papez, James W. 1937. "A Proposed Mechanism of Emotion." *Archives of Neurology And Psychiatry* 38(4): 725–43.
- Parsons, Ryan G., Georgette M. Gafford, and Fred J. Helmstetter. 2006. "Translational Control via the Mammalian Target of Rapamycin Pathway Is Critical for the Formation and Stability of Long-Term Fear Memory in Amygdala Neurons." *Journal of Neuroscience* 26(50): 12977–83.
- Patton, George C., and Russell Viner. 2007. "Pubertal Transitions in Health." *Lancet* 369(9567): 1130–39.
- Pattwell, Siobhan S. et al. 2012. "Altered Fear Learning across Development in Both Mouse and Human." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(40): 16318–23.
- Pattwell, Siobhan S. et al. 2016a. "Dynamic Changes in Neural Circuitry during Adolescence Are Associated with Persistent Attenuation of Fear Memories." *Nature Communications* 7(May): 1–9.
- Pattwell, Siobhan S. et al. 2016b. "Dynamic Changes in Neural Circuitry during Adolescence Are Associated with Persistent Attenuation of Fear Memories." *Nature Communications* 7(May): 1–9.
- Pavliša, Goran, Jurica Papa, Ladislav Pavić, and Gordana Pavliša. 2006. "Bilateral MR Volumetry of the Amygdala in Chronic PTSD Patients." *Collegium Antropologicum* 30(3): 565–68.
- Petanjek, Zdravko et al. 2011. "Extraordinary Neoteny of Synaptic Spines in the Human Prefrontal Cortex." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(32): 13281–86.

- Phelps, Elizabeth A., Mauricio R. Delgado, Katherine I. Nearing, and Joseph E. LeDoux. 2004. "Extinction Learning in Humans: Role of the Amygdala and VmPFC." *Neuron* 43(6): 897–905.
- Pine, Daniel S. et al. 1998. "The Risk for Early-Adulthood Anxiety and Depressive Disorders in Adolescents with Anxiety and Depressive Disorders." *Archives of General Psychiatry* 55(1): 56–64.
- Pinter, O, Z Beda, Z Csaba, and I Gerendai. 2007. "Differences in the Onset of Puberty in Selected Inbred Mouse Strains." *Endocrine Abstracts* 14: 617.
- Pitkänen, Asia, Vesa Savander, and Joseph E. LeDoux. 1997. "Organization of Intra-Amygdaloid Circuitries in the Rat: An Emerging Framework for Understanding Functions of the Amygdala." *Trends in Neurosciences* 20(11): 517–23.
- Pitkänen, Asla et al. 1995. "Intrinsic Connections of the Rat Amygdaloid Complex: Projections Originating in the Lateral Nucleus." *Journal of Comparative Neurology* 356(2): 288–310.
- Pitkänen, Asla, Maria Pikkarainen, Nina Nurminen, and Aarne Ylinen. 2000. "Reciprocal Connections between the Amygdala and the Hippocampal Formation, Perirhinal Cortex, and Postrhinal Cortex in Rat." *Annals of the New York Academy of Sciences* 911: 369–91.
- Pohl, Joanna et al. 2007. "Repeated Exposure to Stress Across the Childhood-Adolescent Period Alters Rats' Anxiety- and Depression-Like Behaviors in Adulthood: The Importance of Stressor Type and Gender." *Behavioral Neuroscience* 121(3): 462–74.
- Pollack, Gabrielle A. et al. 2018. "Cued Fear Memory Generalization Increases over Time." *Learning and Memory* 25(7): 298–308.
- Prager, Eric M, Hadley C Bergstrom, Gary H Wynn, and Maria F M Braga. 2016. "The Basolateral Amygdala GABAergic System in Health and Disease." *Journal Neurosci Res* 94(6): 548–67.
- Preibisch, Stephan, Stephan Saalfeld, and Pavel Tomancak. 2009. "Globally Optimal Stitching of Tiled 3D Microscopic Image Acquisitions." *Bioinformatics* 25(11): 1463–65.
- Protopopescu, Xenia et al. 2005. "Differential Time Courses and Specificity of Amygdala Activity in Posttraumatic Stress Disorder Subjects and Normal Control Subjects." *Biological Psychiatry* 57(5): 464–73.
- Pugh, C. Rachal, Darren Tremblay, Monika Fleshner, and Jerry W. Rudy. 1997. "A Selective Role for Corticosterone in Contextual-Fear Conditioning." *Behavioral Neuroscience* 111(3): 503–11.
- Quirk, Gregory J., and Devin Mueller. 2008. "Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval." *Neuropsychopharmacology* 33(1): 56–72.
- Quirk, Gregory J., J. Christopher Repa, and Joseph E. LeDoux. 1995. "Fear Conditioning Enhances Short-Latency Auditory Responses of Lateral Amygdala Neurons: Parallel Recordings in the Freely Behaving Rat." *Neuron* 15(5): 1029–39.
- Quirk, Gregory J., Gregory K. Russo, Jill L. Barron, and Kelimer Lebron. 2000. "The Role of Ventromedial Prefrontal Cortex in the Recovery of Extinguished Fear." *Journal of Neuroscience* 20(16): 6225–31.

- Radley, Jason J et al. 2009. "Repeated Stress Alters Dendritic Spine Morphology." *Journal of Comparative Neurology* 507(1): 1141–50.
- Rauch, Scott L. et al. 2000. "Exaggerated Amygdala Response to Masked Facial Stimuli in Posttraumatic Stress Disorder: A Functional MRI Study." *Biological Psychiatry* 47(9): 769–76.
- Rauch, Scott L., Lisa M. Shin, and Elizabeth A. Phelps. 2006. "Neurocircuitry Models of Posttraumatic Stress Disorder and Extinction: Human Neuroimaging Research-Past, Present, and Future." *Biological Psychiatry* 60(4): 376–82.
- Reith, R. Michelle et al. 2013. "Loss of Tsc2 in Purkinje Cells Is Associated with Autistic-like Behavior in a Mouse Model of Tuberous Sclerosis Complex." *Neurobiology of Disease* 51: 93–103.
- Repa, J. Christopher et al. 2001. "Two Different Lateral Amygdala Cell Populations Contribute to the Initiation and Storage of Memory." *Nature Neuroscience* 4(7): 724–31.
- Rescorla, Robert A. 2001. "Retraining of Extinguished Pavlovian Stimuli." *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 27(2): 115–24.
- Rescorla, Robert A. 2004. "Spontaneous Recovery Varies Inversely with the Training-Extinction Interval." *Learning and Behavior* 32(4): 401–8.
- Resnik, Jennifer, and Rony Paz. 2015. "Fear Generalization in the Primate Amygdala." *Nature Neuroscience* 18(2): 188–90.
- Rice, Deborah, and Stan Barone. 2000. "Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models." *Environmental Health Perspectives* 108(SUPPL. 3): 511–33.
- Richter-Levin, Gal. 1998. "Acute and Long-Term Behavioral Correlates of Underwater Trauma-Potential Relevance to Stress and Post-Stress Syndromes." *Psychiatry Research* 79(1): 73–83.
- Ritov, Gilad, and Gal Richter-Levin. 2014. "Water Associated Zero Maze: A Novel Rat Test for Long Term Traumatic Re-Experiencing." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 8: 1–6.
- Rogan, M. T., U. V. Staubli, and J. E. LeDoux. 1997. "Fear Conditioning Induces Associative Long-Term Potentiation in the Amygdala." *Nature* 390(6660): 604–7.
- Romeo, R. D. 2010. "Pubertal Maturation and Programming of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Reactivity." *Frontiers in Neuroendocrinology* 31(2): 232–40.
- Romeo, Russell D., Ilia N. Karatsoreos, and Bruce S. McEwen. 2006. "Pubertal Maturation and Time of Day Differentially Affect Behavioral and Neuroendocrine Responses Following an Acute Stressor." *Hormones and Behavior* 50(3): 463–68.
- Romijn, Herms J., Michel A. Hofman, and Albert Gramsbergen. 1991. "At What Age Is the Developing Cerebral Cortex of the Rat Comparable to That of the Full-Term Newborn Human Baby?" *Early Human Development* 26(1): 61–67.
- Ronzoni, Giacomo, Alberto del Arco, Francisco Mora, and Gregorio Segovia. 2016. "Enhanced

- Noradrenergic Activity in the Amygdala Contributes to Hyperarousal in an Animal Model of PTSD." *Psychoneuroendocrinology* 70: 1–9.
- Roosendaal, Benno et al. 2006. "Basolateral Amygdala Noradrenergic Activity Mediates Corticosterone-Induced Enhancement of Auditory Fear Conditioning." *Neurobiology of Learning and Memory* 86(3): 249–55.
- Rosenkranz, J. Amiel, Holly Moore, and Anthony A. Grace. 2003. "The Prefrontal Cortex Regulates Lateral Amygdala Neuronal Plasticity and Responses to Previously Conditioned Stimuli." *Journal of Neuroscience* 23(35): 11054–64.
- Royer, S., and D. Paré. 2002. "Bidirectional Synaptic Plasticity in Intercalated Amygdala Neurons and the Extinction of Conditioned Fear Responses." *Neuroscience* 115(2): 455–62.
- Royer, Sébastien, Marzia Martina, and Denis Paré. 1999. "An Inhibitory Interface Gates Impulse Traffic between the Input and Output Stations of the Amygdala." *Journal of Neuroscience* 19(23): 10575–83.
- Rubinow, Marisa J., and M. Juras, Janice. 2009. "Neuron and Glia Numbers in the Basolateral Nucleus of the Amygdala from Prewaning through Old Age in Male and Female Rats." *J Comp Neurol* 512(6): 717–25.
- Rudy, Bernardo, Gordon Fishell, SooHyun Lee, and Jens Hjerling-Leffler. 2011. "Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons." *Developmental neurobiology* 71(1): 45–61.
- Rudy, Jerry W., and C. Rachal Pugh. 1996. "A Comparison of Contextual and Generalized Auditory-Cue Fear Conditioning: Evidence for Similar Memory Processes." *Behavioral Neuroscience* 110(6): 1299–1308.
- Rumball, Freya, Francesca Happé, and Nick Grey. 2020. "Experience of Trauma and PTSD Symptoms in Autistic Adults: Risk of PTSD Development Following DSM-5 and Non-DSM-5 Traumatic Life Events." *Autism Research*. 1–11.
- Rumpel, Simon, Joseph LeDoux, Anthony Zador, and Roberto Malinow. 2005. "Postsynaptic Receptor Trafficking Underlying a Form of Associative Learning." *Science* 308(5718): 83–88.
- Russo, Scott et al. 2012. "Neurobiology of Resilience." *Nature Neuroscience* 15(11): 1475–84.
- Ryan, Steven J., David E. Ehrlich, and Donald G. Rainnie. 2016. "Morphology and Dendritic Maturation of Developing Principal Neurons in the Rat Basolateral Amygdala Steven." *Brain Structure and Function* 221(2): 839–54.
- Saha, Rinki et al. 2017. "GABAergic Synapses at the Axon Initial Segment of Basolateral Amygdala Projection Neurons Modulate Fear Extinction." *Neuropsychopharmacology* 42(2): 473–84.
- Saha, Rinki et al. 2018. "Perturbation of GABAergic Synapses at the Axon Initial Segment of Basolateral Amygdala Induces Trans-Regional Metaplasticity at the Medial Prefrontal Cortex." *Cerebral Cortex* 28(1): 395–410.
- Schachter, Stanley, and Jerome Singer. 1965. "Cognitive, Social, and Psychological

- Determinants of Emotional State." *Psychological Review* 69(5): 379–99.
- Scherer, K R. 1984. "Emotion as a Multicomponent Process: A Model and Some Cross-Cultural Data. Review of Personality and Social Psychology." *Review of Personality & Social Psychology* 5: 37–63.
- Schindelin, Johannes et al. 2009. "Fiji - an Open Platform for Biological Image Analysis." *Nature Methods* 9(7).
- Schochet, TL, AE Kelley, and CF Landry. 2005. "Differential Expression of Arc mRNA and Other Plasticity-Related Genes Induced by Nicotine in Adolescent Rat Forebrain." *Neuroscience* 135(1): 285–97.
- SCOVILLE, W. B., and B. MILNER. 1957. "Loss of Recent Memory after Bilateral Hippocampal Lesions." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 20(1): 11–21.
- Shaban, Hamdy et al. 2006. "Generalization of Amygdala LTP and Conditioned Fear in the Absence of Presynaptic Inhibition." *Nature Neuroscience* 9(8): 1028–35.
- Shapiro, Lauren P., Ryan G. Parsons, Anthony J. Koleske, and Shannon L. Gourley. 2017. "Differential Expression of Cytoskeletal Regulatory Factors in the Adolescent Prefrontal Cortex: Implications for Cortical Development." *Journal of Neuroscience Research* 95(5): 1123–43.
- Shin, Lisa M. et al. 2004. "Regional Cerebral Blood Flow in the Amygdala and Medial Prefrontal Cortex during Traumatic Imagery in Male and Female Vietnam Veterans with PTSD." *Archives of General Psychiatry* 61(2): 168–76.
- Shin, Lisa M. et al. 2009. "Resting Metabolic Activity in the Cingulate Cortex and Vulnerability to Posttraumatic Stress Disorder." *Archives of General Psychiatry* 66(10): 1099–1107.
- Shin, Lisa M., and Kathryn Handwerker. 2009. "Is Posttraumatic Stress Disorder A Stress-Induced Fear Circuitry Disorder?" *Journal of traumatic stress* 22(5): 409–15.
- Shin, Lisa M., Scott L. Rauch, and Roger K. Pitman. 2006. "Amygdala, Medial Prefrontal Cortex, and Hippocampal Function in PTSD." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1071: 67–79.
- Sierra-Mercado, Demetrio, Kevin A. Corcoran, Kelimer Lebrón-Milad, and Gregory J. Quirk. 2006. "Inactivation of the Ventromedial Prefrontal Cortex Reduces Expression of Conditioned Fear and Impairs Subsequent Recall of Extinction." *European Journal of Neuroscience* 24(6): 1751–58.
- Sierra-Mercado, Demetrio, Nancy Padilla-Coreano, and Gregory J. Quirk. 2011a. "Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear." *Neuropsychopharmacology* 36(2): 529–38.
- Sierra-Mercado, Demetrio, Nancy Padilla-Coreano, and Gregory J. Quirk. 2011b. "Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear." *Neuropsychopharmacology* 36(2): 529–38.

- Sigmundi, Ronald A., Mark E. Bouton, and Robert C. Bolles. 1980. "Conditioned Freezing in the Rat as a Function of Shock Intensity and CS Modality." *Bulletin of the Psychonomic Society* 15(4): 254–56.
- Silva, Bianca A., Cornelius T. Gross, and Johannes Gräff. 2016. "The Neural Circuits of Innate Fear: Detection, Integration, Action, and Memorization." *Learning and Memory* 23(10): 544–55.
- Singewald, N. et al. 2015. "Pharmacology of Cognitive Enhancers for Exposure-Based Therapy of Fear, Anxiety and Trauma-Related Disorders." *Pharmacology and Therapeutics* 149: 150–90.
- Sisk, Cheryl L., and Douglas L. Foster. 2004. "The Neural Basis of Puberty and Adolescence." *Nature Neuroscience* 7(10): 1040–47.
- Skelly, MJ, AE Chappell, E Carter, and Weiner JL. 2015. "Adolescent Social Isolation Increases Anxiety-like Behavior and Ethanol Intake and Impairs Fear Extinction in Adulthood: Possible Role of Disrupted Noradrenergic Signaling." *Neuroph* 97: 149–59.
- Smith, Robert F. et al. 2015. "Adolescent Nicotine Induces Persisting Changes in Development of Neural Connectivity." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 55: 432–43.
- Smith, Y., and D. Paré. 1994. "Intra-amygdaloid Projections of the Lateral Nucleus in the Cat: PHA-L Anterograde Labeling Combined with Postembedding GABA and Glutamate Immunocytochemistry." *Journal of Comparative Neurology* 342(2): 232–48.
- Somerville, Leah H., Rebecca M. Jones, and B.J. Casey. 2010. "A Time of Change: Behavioral and Neural Correlates of Adolescent." *Brain and Cognition* 72(1): 1–21.
- Sotres-Bayon, Francisco, and Gregory J. Quirk. 2010. "Prefrontal Control of Fear: More than Just Extinction." 20(2): 231–35.
- Sotres-Bayon, Francisco, Demetrio Sierra-Mercado, Enmanuelle Pardilla-Delgado, and Gregory J. Quirk. 2012. "Gating of Fear in Prelimbic Cortex by Hippocampal and Amygdala Inputs." *Neuron* 76(4): 804–12.
- Spampanato, Jay, Jai Polepalli, and Pankaj Sah. 2011. "Interneurons in the Basolateral Amygdala." *Neuropharmacology* 60(5): 765–73.
- Spear, L P. 2000. 24 Neuroscience & Biobehavioral Reviews *The Adolescent Brain and Age-Related Behavioral Manifestations*.
- Staiger, J. F. et al. 2002. "Excitatory and Inhibitory Neurons Express C-Fos in Barrel-Related Columns after Exploration of a Novel Environment." *Neuroscience* 109(4): 687–99.
- Stein, Murray B. et al. 2002. "Genetic and Environmental Influences on Trauma Exposure and Posttraumatic Stress Disorder Symptoms: A Twin Study." *American Journal of Psychiatry* 159(10): 1675–81.
- Steinberg, Laurence. 2004. "Risk Taking in Adolescence: What Changes, and Why?" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1021: 51–58.
- Strobel, Cornelia et al. 2015. "Prefrontal and Auditory Input to Intercalated Neurons of the

- Amygdala." *Cell Reports* 10(9): 1435–42.
- Strobel, Cornelia, Robert K.P. Sullivan, Peter Stratton, and Pankaj Sah. 2017. "Calcium Signalling in Medial Intercalated Cell Dendrites and Spines." *Journal of Physiology* 595(16): 5653–69.
- Swanson, L. W. 1981. "A Direct Projection from Ammon's Horn to Prefrontal Cortex in the Rat." *Brain Research* 217(1): 150–54.
- Swanson, Larry W., and Gorica D. Petrovich. 1998. "What Is the Amygdala?" *Trends in Neurosciences* 21(8): 323–31.
- Switon, Katarzyna et al. 2017. "Molecular Neurobiology of MTOR." *Neuroscience* 341: 112–53.
- Talos, Delia M. et al. 2008. "Cell-Specific Alterations of Glutamate Receptor Expression in Tuberous Sclerosis Complex Cortical Tubers." *Annals of Neurology* 63(4): 454–65.
- Talos, Delia M. et al. 2012. "The Interaction between Early Life Epilepsy and Autistic-like Behavioral Consequences: A Role for the Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Pathway." *PLoS ONE* 7(5): 1–16.
- Tang, Guomei et al. 2014. "Loss of MTOR-Dependent Macroautophagy Causes Autistic-like Synaptic Pruning Deficits." *Neuron* 83(5): 1131–43.
- Tee, Andrew R., Julian R. Sampson, Deb K. Pal, and Joseph M. Bateman. 2016. "The Role of MTOR Signalling in Neurogenesis, Insights from Tuberous Sclerosis Complex." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 52: 12–20.
- Thomases, Daniel R., Daryn K. Cass, and Kuei Y. Tseng. 2013. "Periadolescent Exposure to the NMDA Receptor Antagonist MK-801 Impairs the Functional Maturation of Local GABAergic Circuits in the Adult Prefrontal Cortex." *Journal of Neuroscience* 33(1): 26–34.
- Toledo-Rodriguez, Maria, and Carmen Sandi. 2007. "Stress before Puberty Exerts a Sex- and Age-Related Impact on Auditory and Contextual Fear Conditioning in the Rat." *Neural Plasticity* 2007.
- Tottenham, Nim et al. 2010. "Prolonged Institutional Rearing Is Associated with Atypically Larger Amygdala Volume and Difficulties in Emotion Regulation." *Developmental Neuroscience* 13(1): 1–26.
- Tottenham, Nim et al. 2014. "Elevated Amygdala Response to Faces and Gaze Aversion in Autism Spectrum Disorder." *Social Cognitive and Affective Neuroscience* 9(1): 106–17.
- Tottenham, Nim, and Laurel Gabard-Durnam. 2017. "The Developing Amygdala: A Student of the World and a Teacher of the Cortex." *Current opinion in psychology* 17: 55–60.
- Tsai, Victoria, and Peter Crino. 2012. "Tuberous Sclerosis Complex: Genetic Basis and Management Strategies." *Advances in Genomics and Genetics* (2): 19–31.
- Tsoory, Michael, Hagit Cohen, and Gal Richter-Levin. 2007. "Juvenile Stress Induces a Predisposition to Either Anxiety or Depressive-like Symptoms Following Stress in Adulthood." *European Neuropsychopharmacology* 17(4): 245–56.
- Tsoory, Michael, and Gal Richter-Levin. 2006. "Learning under Stress in the Adult Rat Is Differentially Affected by 'juvenile' or 'Adolescent' Stress." *International Journal of*

Neuropsychopharmacology 9(6): 713–28.

- Tyzio, Roman et al. 1999. "The Establishment of GABAergic and Glutamatergic Synapses on CA1 Pyramidal Neurons Is Sequential and Correlates with the Development of the Apical Dendrite." *Journal of Neuroscience* 19(23): 10372–82.
- Tzanoulinou, S., O. Riccio, M. W. De Boer, and C. Sandi. 2014. "Peripubertal Stress-Induced Behavioral Changes Are Associated with Altered Expression of Genes Involved in Excitation and Inhibition in the Amygdala." *Translational Psychiatry* 4(7): e410-9.
- Uematsu, Akiko et al. 2012. "Developmental Trajectories of Amygdala and Hippocampus from Infancy to Early Adulthood in Healthy Individuals." *PLoS ONE* 7(10).
- Vanderschuren, Louk J.M.J., Marijke Achterberg, and Viviana Trezza. 2016. "The Neurobiology of Social Play and Its Rewarding Value in Rats." *Physiology & behavior* 70: 86–105.
- VanTieghem, Michelle, and Nim Tottenham. 2018. "Neurobiological Programming of Early Life Stress: Functional Development of Amygdala-Prefrontal Circuitry and Vulnerability for Stress-Related Psychopathology." *Curr Top Behav Neurosci.* 38: 117–36.
- Varty, Geoffrey B., Martin P. Paulus, David L. Braff, and Mark A. Geyer. 2000. "Environmental Enrichment and Isolation Rearing in the Rat: Effects on Locomotor Behavior and Startle Response Plasticity." *Biological Psychiatry* 47(10): 864–73.
- Vermetten, Eric, Christian Schmahl, Steven M. Southwick, and J. Douglas Bremner. 2007. "Positron Tomographic Emission Study of Olfactory Induced Emotional Recall in Veterans with and without Combat-Related Posttraumatic Stress Disorder." *Psychopharmacology bulletin* 40(1): 8–30.
- Vertes, Robert P. 2004. "Differential Projections of the Infralimbic and Prelimbic Cortex in the Rat." *Synapse* 51(1): 32–58.
- Verwer, R. W.H., E. H.S. Van Vulpen, and J. F.M. Van Uum. 1996. "Postnatal Development of Amygdaloid Projections to the Prefrontal Cortex in the Rat Studied with Retrograde and Anterograde Tracers." *Journal of Comparative Neurology* 376(1): 75–96.
- Vidal-Gonzalez, Ivan, Benjamín Vidal-Gonzalez, Scott L. Rauch, and Gregory J. Quirk. 2006. "Microstimulation Reveals Opposing Influences of Prelimbic and Infralimbic Cortex on the Expression of Conditioned Fear." *Learning and Memory* 13(6): 728–33.
- Vieira, Philip A. et al. 2015. "Prefrontal NMDA Receptors Expressed in Excitatory Neurons Control Fear Discrimination and Fear Extinction." *Neurobiology of Learning and Memory* 119: 52–62.
- Vincent, Stephen L., Laurie Pabreza, and Francine M. Benes. 1995. "Postnatal Maturation of GABA-immunoreactive Neurons of Rat Medial Prefrontal Cortex." *Journal of Comparative Neurology* 355(1): 81–92.
- Vyas, A., A. G. Pillai, and S. Chattarji. 2004. "Recovery after Chronic Stress Fails to Reverse Amygdaloid Neuronal Hypertrophy and Enhanced Anxiety-like Behavior." *Neuroscience* 128(4): 667–73.
- Vyas, Ajai, Savita Bernal, and Sumantra Chattarji. 2003. "Effects of Chronic Stress on Dendritic

- Arborization in the Central and Extended Amygdala." *Brain Research* 965(1–2): 290–94.
- Vyas, Ajai, Rupshi Mitra, B. S. Shankaranarayana Rao, and Sumantra Chattarji. 2002. "Chronic Stress Induces Contrasting Patterns of Dendritic Remodeling in Hippocampal and Amygdaloid Neurons." *Journal of Neuroscience* 22(15): 6810–18.
- Wallace, Karin J., and Jeffrey B. Rosen. 2001. "Neurotoxic Lesions of the Lateral Nucleus of the Amygdala Decrease Conditioned Fear but Not Unconditioned Fear of a Predator Odor: Comparison with Electrolytic Lesions." *Journal of Neuroscience* 21(10): 3619–27.
- Wang, Anfeng et al. 2020. "Early-Life Stress Alters Synaptic Plasticity and MTOR Signaling: Correlation With Anxiety-Like and Cognition-Related Behavior." *Frontiers in Genetics* 11(December): 1–11.
- Wang, Qingzhong, Richard C Shelton, and Yogesh Dwivedi. 2018. "Interaction between Early-Life Stress and FKBP5 Gene Variants in Major Depressive Disorder and Post-Traumatic Stress Disorder: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of affective disorders* 225(1): 422–28.
- Wang, Xiaochen et al. 2016. "Persistent Hyperactivity of Hippocampal Dentate Interneurons after a Silent Period in the Rat Pilocarpine Model of Epilepsy." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10(APR): 1–14.
- Wang, Xinjun, Chunzhao Zhang, Gabor Szabo, and Qian-Quan Sun. 2013. "Distribution of CaMKII α Expression in the Brain in Vivo, Studied by CaMKII α -GFP Mice." *Brain Research* 1518: 9–25.
- Wang, Yanling et al. 2007. "Neocortical Hyperexcitability in a Human Case of Tuberous Sclerosis Complex and Mice Lacking Neuronal Expression of TSC1." *Annals of Neurology* 61(2): 139–52.
- WEISKRANTZ, L. 1956. "Behavioral Changes Associated with Ablation of the Amygdaloid Complex in Monkeys." *Journal of comparative and physiological psychology* 49(4): 381–91.
- Wellman, Cara L. 2001. "Dendritic Reorganization in Pyramidal Neurons in Medial Prefrontal Cortex after Chronic Corticosterone Administration." *Journal of Neurobiology* 49(3): 245–53.
- Van De Werd, H. J.J.M., G. Rajkowska, P. Evers, and H. B.M. Uylings. 2010. "Cytoarchitectonic and Chemoarchitectonic Characterization of the Prefrontal Cortical Areas in the Mouse." *Brain Structure and Function* 214(4): 339–53.
- Whitaker, Annie M., Nicholas W. Gilpin, and Scott Edwards. 2014. "Animal Models of Post-Traumatic Stress Disorder and Recent Neurobiological Insights." *Behavioural Pharmacology* 25(5–6): 398–409.
- White, Paul, Walter Way, and Anthony Trevor. 1982. "Ketamine - Its Pharmacology and Therapeutic Uses." *Anesthesiology* 56(2): 119–36.
- White, Ricarda et al. 2001. "Selective Alterations in Glutamate and GABA Receptor Subunit mRNA Expression in Dysplastic Neurons and Giant Cells of Cortical Tubers." *Annals of*

Neurology 49(1): 67–78.

- Wicking, Manon et al. 2016. 136 Neurobiology of Learning and Memory *Deficient Fear Extinction Memory in Posttraumatic Stress Disorder*.
- Winocur, Gordon, and Mary Gilbert. 1984. "The Hippocampus, Context, and Information Processing." *Behavioral and Neural Biology* 40(1): 27–43.
- Woodruff, Alan R., Hannah Monyer, and Pankaj Sah. 2006. "GABAergic Excitation in the Basolateral Amygdala." *Journal of Neuroscience* 26(46): 11881–87.
- Wotjak, C.T., and H.-C. Pape. 2013. "Neuronal Circuits of Fear Memory and Fear Extinction." *e-Neuroforum* 19(3): 47–56.
- Yang, Charles R., Jeremy K. Seamans, and Natalia Gorelova. 1996. "Electrophysiological and Morphological Properties of Layers V-VI Principal Pyramidal Cells in Rat Prefrontal Cortex in Vitro." *Journal of Neuroscience* 16(5): 1904–21.
- Young, Erica J., and Cedric L. Williams. 2013. "Differential Activation of Amygdala Arc Expression by Positive and Negatively Valenced Emotional Learning Conditions." *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 7(DEC): 1–13.
- Yuan, Z, and X Ju. 2009. "Gating of Fear in Prelimbic Cortex by Hippocampal and Amygdala Inputs." *Management Review* 76(4): 804–12.
- Zhang, Kunlin et al. 2020. "Correlation between Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Gene Polymorphisms and Posttraumatic Stress Disorder Symptoms." *Hormones and Behavior* 117(September 2019): 104604.
- Zhang, Xiangyu, Joshua Kim, and Susumu Tonegawa. 2019. "Amygdala Reward Neurons Form and Store Fear Extinction Memory." *bioRxiv*.
- Zhang, Xin et al. 2018. "Stress-Induced Functional Alterations in Amygdala: Implications for Neuropsychiatric Diseases." *Frontiers in Neuroscience* 12(MAY): 1–9.
- Zhu, Jia, Temitope O. Kusa, and Yee Ming Chan. 2018. "Genetics of Pubertal Timing." *Current Opinion in Pediatrics* 30(4): 532–40.
- Zimmerman, Joshua M., and Stephen Maren. 2010. "NMDA Receptor Antagonism in the Basolateral but Not Central Amygdala Blocks the Extinction of Pavlovian Fear Conditioning in Rats." *European Journal of Neuroscience* 31(9): 1664–70.
- Zimmermann, Kelsey S., Rick Richardson, and Kathryn D. Baker. 2019. "Maturational Changes in Prefrontal and Amygdala Circuits in Adolescence: Implications for Understanding Fear Inhibition during a Vulnerable Period of Development." *Brain Sciences* 9(3).
- Ziv, Noam E., and Craig C. Garner. 2004. "Cellular and Molecular Mechanisms of Presynaptic Assembly." *Nature Reviews Neuroscience* 5(5): 385–99.
- Zuj, D., M. Palmer, K. Felmingham, and M. Lommen. 2016. "The Centrality of Fear Extinction in Linking Risk Factors to PTSD: A Narrative Review." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 69.
- Zuj, Daniel V. et al. 2016. "IMPAIRED FEAR EXTINCTION ASSOCIATED with PTSD INCREASES

with HOURS-SINCE-WAKING." *Depression and Anxiety* 33(3): 203–10.

Impacts d'une perturbation de la voie TSC2/mTOR dans l'amygdale dès l'adolescence sur le comportement de peur et la fonctionnalité du cortex préfrontal chez le rat adulte

Mots clés : Développement cérébral, Comportement de peur, Circuit de la peur, Syndrome de Stress Post-Traumatique

L'adolescence est une période développementale vulnérable marquée par d'intenses modifications structurelles et fonctionnelles des réseaux qui assurent la régulation des comportements émotionnels et cognitifs. Les processus de maturation de ces réseaux sont influencés par les facteurs environnementaux et génétiques. Le syndrome de stress post-traumatique (PTSD) est un trouble psychiatrique caractérisé par des peurs exagérées, des généralisations de la peur et des déficits d'extinction de peur. Les facteurs de prédisposition au PTSD sont peu connus, mais nous savons qu'un stress intense subi au cours de l'adolescence favorise son apparition à l'âge adulte lorsqu'un individu est confronté à un nouvel événement traumatique.

Au cours de cette thèse, nous avons étudié la fonctionnalité de deux structures du circuit de la peur, l'amygdale et le cortex préfrontal, qui suivent une maturation asynchrone. L'amygdale étant fonctionnellement mature à l'âge juvénile, elle est en position de modifier la maturation tardive du cortex préfrontal (mPFC).

Nous avons donc voulu tester l'impact d'une dérégulation de la voie Tsc2/mTOR dans les cellules excitatrices du noyau basolatéral de l'amygdale (BLA) du rat au début (25 jours post-natal, PN25), ou à la fin (PN50) de l'adolescence. Le comportement émotionnel à l'âge adulte a été évalué à l'aide d'un conditionnement Pavlovien et l'activité basale du mPFC par la mesure de l'expression du gène immédiat précoce c-FOS. Nous montrons que seuls les rats altérés à l'adolescence (PN25) présentent à l'âge adulte des symptômes typiques du PTSD (déficit d'extinction et généralisation de la peur), associés à une augmentation de l'activité basale du mPFC, en particulier dans les couches corticales impliquées dans le maintien de la mémoire de peur. Ainsi, une modification de la fonctionnalité de l'amygdale au début de l'adolescence pourrait être un facteur de prédisposition à l'apparition d'un PTSD à l'âge adulte.

Impacts of a TSC2/mTOR pathway disruption in the amygdala from adolescence on fear behavior and prefrontal cortex functionality at adult age in rat.

Keywords : Brain development, fear behavior, fear network, Post-Traumatic Stress Disorder

Adolescence is a highly sensitive developmental period characterized by massive structural and functional changes in networks regulating emotional and cognitive behaviors, with maturational processes influenced by environmental and genetical factors. Post-traumatic stress disorder (PTSD) is a psychiatric disorder characterized by an exaggerated fear, overgeneralization, and deficits in fear extinction. Nowadays, genetical and/or environmental predispositional factors for PTSD are not fully understood, but we know that an intense stress or a trauma endured during adolescence promotes the appearance of PTSD at adulthood following a novel trauma exposure.

In this thesis, we particularly studied two structures that belong to the fear-network, the amygdala and prefrontal cortex, which follow an asynchronous maturation. While the amygdala is functionally mature at a juvenile age, its activity could impact the late maturation of the medial prefrontal cortex (mPFC).

We aimed to study the impact of a disruption of Tsc2/mTOR pathway in the excitatory cells of the basolateral nucleus of the amygdala (BLA) in rats at young adolescence (post-natal day 25, PN25) or at the end of adolescence (PN50). When animals had reached adulthood, we assessed emotional behavior through a Pavlovian fear conditioning protocol, and the basal mPFC activity through the measure of expression of immediate early gene c-FOS. We show that only animals altered during young adolescence presented at the adult age typical symptoms of PTSD (fear extinction deficits, overgeneralization of fear), associated with an increase of mPFC basal activity, especially in cortical layers known to be involved in the maintenance of fear memory and expression. Thus, we suggest that a developmental dysfunction of the amygdala early in adolescence could be a predispositional factor to PTSD appearance at adulthood.