

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologie
EQUIPE Comportement, Neurobiologie et Adaptation

THÈSE

présentée par :

Bertrand DESGRANGES

soutenue le : 13 mai 2009

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie/ Neurosciences

ETUDE DES APPRENTISSAGES

OLFACTIFS ALIMENTAIRES :

Importance de l'amygdale basolatérale et du cortex insulaire chez le rat

THÈSE dirigée par :

M. LEVY Frédéric

Directeur de Recherches, INRA Tours Nouzilly

Co-encadrée par

M. FERREIRA Guillaume

Chargé de Recherches, INRA Tours Nouzilly

RAPPORTEURS :

Mme DATICHE Frédérique

Maître de Conférences, université de Bourgogne

M. HARS Bernard

Professeur, université Paris-sud

JURY :

Mme DATICHE Frédérique

Maître de Conférences, université de Bourgogne

Mlle DESMEDT Aline

Maître de Conférences, université Bordeaux 1

M. FERREIRA Guillaume

Chargé de Recherches, INRA

M. HARS Bernard

Professeur, université Paris-sud

M. ISINGRINI Michel

Professeur, université François – Rabelais

M. LEVY Frédéric

Directeur de Recherches, INRA

M. RAMIREZ-AMAYA Victor

Profesor, UNAM (Mexique)

A MG, Reine des Bandits et future grande avocate,

Remerciements

« Peut-être le savoir est –il trop grand, mais peut-être aussi l'homme devient-il trop petit, dit Lee. Peut-être qu'à force de s'agenouiller devant les atomes il finit par avoir une âme de la taille de ce qu'il adore. Peut-être le spécialiste n'est-il qu'un lâche qui a peur de regarder le monde extérieur à sa petite cage. Pensez à ce qu'il perd votre spécialiste : le monde entier qui palpite de l'autre côté de la clôture. »¹

Ecrire des remerciements n'est pas une chose facile en soit, surtout quand ils sont destinés à autant de personnes. Cela provoque en moi une certaine émotion, que j'ai du mal à communiquer. Tâchons d'être bref et de n'oublier personne.

Les premiers vont forcément à Guillaume Ferreira, qui m'a encadré, guidé et tiré tant bien que mal vers le haut durant 3 ans et demi. Les longues heures de manips avec nos amis les rats ont été enrichissantes, parfois pénibles, mais souvent marrantes « tu vois j'veux dire ? ». Un jour, peut-être, en prenant exemple sur toi et ton esprit d'analyse qui ne cesse de m'étonner, je surferai plutôt que simplement maintenir la tête hors de l'eau... Merci pour tout.

Je remercie aussi fortement Frédéric Lévy, « le chef » qui m'a accueilli dans son équipe à l'époque. Merci beaucoup pour le temps passé sur la thèse, pour le regard naïf ou critique c'est selon, que tu as pu porter sur certaines questions et pour ta gentillesse. Merci aussi de m'avoir remis sur les rails au dernier moment, quand je me suis laissé aller. On y serait encore à la St GlinGlin.

Je tiens à remercier tout particulièrement les membres de mon jury Mesdames Frédérique Datiche, Aline Desmedt, Messieurs Bernard Hars, Michel Isingrini et Victor Ramirez-Amaya, qui me font l'honneur d'examiner mes travaux de thèse et d'en discuter lors de la soutenance. J'espère ne pas vous avoir fait patienter auquel cas je vous présente mes plus plates excuses. Une mention spéciale est destinée à deux de ces membres. La première pour Mlle Aline Desmedt sans qui je n'aurais jamais fait cette thèse. Un coup de téléphone un après midi de fin d'été, sur un green de golf, a fait basculé le cours des choses. Un voyage s'est arrêté à Tours, première étape saugrenue sur la route de l'Orient. Mais la halte s'est révélée être une expérience formidable et j'en repars grandi. La vie réserve souvent de drôles de surprises... Merci d'avoir cru en moi et de continuer en faisant partie de mon jury. La seconde est bien évidemment pour mon ami mexicain Victor, esprit d'une vivacité extraordinaire et gourmet insatiable devant l'éternel. Dire que tu as fait tout ce

¹STEINBECK John, *A l'est d'Eden*, 1952

voyage depuis le Nouveau Monde pour venir m'écouter et finir l'article, j'en suis très honoré. N'y aurait-il pas aussi la perspective de retrouver la culture rabelaisienne et sa fantastique gastronomie ? L'expérience mexicaine a probablement été l'une des plus riches de ma vie, tant sur le plan scientifique et intellectuel, que sur le plan humain. L'envie d'y retourner est immense.

Merci infiniment aux personnes qui ont fait partie de mon comité de thèse, Nadine Ravel et Barbara Ferry entre autres, qui m'ont aidé à mettre au point cette thèse et ainsi y voir plus clair. Mille mercis à tous les gens de l'équipe Comportement, Neurobiologie et Adaptation : merci à Maryse Meurisse pour les coups de mains techniques indispensables ; à Nicole Jouaneau pour son aide tellement précieuse dans les tâches fastidieuses et pour avoir si souvent satisfait ma gourmandise ; à Polo Constantin pour ses conseils BD et son inépuisable stocks de charades, contrepèteries et autres jeux de mots, à Pascal Poindron, Léa Lansade, Raymond Novak, Elodie Chaillou, Mathieu Keller, Ludovic Calandreau, Christine Leterrier et Cecile Arnould pour leurs conseils avisés et leurs connaissances dans quantité de domaines ; à Yannick Sevelinges car c'est un monsieur, une personne sur laquelle on peut compter et surtout, surtout, un esprit non formaté et sacrément pointu qui suit l'actualité sportive autant que moi ; aux stagiaires passées et actuelles : Cécile pour les discussions de bureau sur nos problèmes bénins; et Jessica que, malgré certains côtés exaspérants au possible, je porte dans mon cœur. Une pensée pour ma formidable Juliette Cognié, you definitely rock Julietta.

Je tiens à remercier chaleureusement les personnes de la raterie au contact de qui j'ai passé un temps considérable. Claude Cahier, pour l'intérêt porté à mes travaux et pour ses histoires de chasse rocambolesques ; Jean-Claude Braguet (vive la quille), pour sa sollicitude, les petits bonus accordés pour les manips et son authenticité qui en fait une personne vraie ; Chantal Moussu et Fabien Cornilleau pour les habituations et « chir » qui sans eux ne seraient pas encore finies. Merci aussi aux personnes de l'informatique, Jean-Yves Durbize, Julien Gangnieux et Daniel Tanguy pour leur dévouement et leur temps précieux.

Ensuite il y a tous les membres de la bande de l'INRA, et ils sont nombreux : merci à Vincenzo et Delphinova pour être de vrais amis ; Astrid, la première à rigoler à mes blagues, Galliano « le fétichiste » pour s'aimer autant que moi, Marianne pour sa joie de vivre et Indiana Jones ; Barbara pour sa générosité sans limite et sa tête de mule, Céline ex voisine, Benoît pour sa grande taille, Denilson, François, Roselyne, Salim et Manon, Timothée et Grégoire les Ken et Ryu de l'INRA. Merci aussi à tous les copains de l'Elan Vouvrillon, le rugby a été un exutoire parfait. Un immense merci à mes deux alcoolytes, Clementito et Julien, pour m'avoir appris à jouer au 421 et découvrir le vignoble ligérien. Vous faites partie des vrais amis que je me suis fait ici. Un gran abrazo tambien para la banda de los pavos,

Mac (mi carnal), Jimena, Marisela, Mayita, Fer & Myriam y todos los otros... extraño tantissimo la vida con ustedes. Enfin parmi tous les gens rencontrés, il y a le noyau de la coloc : Big Up, à Hélène d'abord, celle de la première heure, avec qui j'ai partagé des moments plus que privilégiés. J'adorais te raconter mes soirées et discuter de tes histoires de f.... pendant que je faisais la cuisine! Promis je viens à la montagne. Longue vie à toi et Franck ! A Thomas ensuite, le Rejetas initial aujourd'hui pilier de cette coloc. Merci d'être mon pote tout simplement, d'avoir partagé cette année et demi bon gré mal gré par exemple en limitant l'expression de mon ego. Marie, merci d'être arrivé et d'avoir révélé le punk qui sommeillait en lui. Prends soin de lui quand je serai parti. Nico enfin, le second rejetas, mais surtout le guide historique à la culture incommensurable. Nous n'avons passé que trop peu de temps ensemble... va falloir rattraper ça sur les bords de la Prut.

Merci à toute ma famille qui me permet d'avancer en sachant toujours que derrière moi, il existe une base stable qui ne faillit pas. Merci au Bengal Tiger et à tous les membres du virage et de la vallée, l'essence même de l'amitié et ma seconde famille. Sache cher B.T. que j'ai enfin compris pourquoi il était si important de construire des cimetières de lucanes. Il aura fallu attendre 20 ans.

Comment conclure sans remercier infiniment MG, qui me montre l'exemple chaque jour. Merci d'être la rigueur dont j'ai besoin, la victime de mes nouvelles prises de catch et le (gros) grain de folie qui me fait perdre mes moyens. « Te baccio la bocca tremente ». Il me tarde de commencer notre nouvelle vie commune.

Résumé

Dans la perspective de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les apprentissages olfactifs alimentaires, nous avons investigué les bases neurobiologiques de l'aversion olfactive conditionnée (AOC) et de la préférence olfactive conditionnée (POC). Nous nous sommes intéressés au rôle joué par deux structures de convergence des informations olfactives, gustatives et viscérales, le noyau basolatéral de l'amygdale (NBL) et le cortex insulaire (CI). Une approche pharmacologique nous permet de montrer que le NBL est indispensable à l'acquisition, la consolidation et le rappel de l'AOC. A contrario, le CI n'est nécessaire à aucune de ces étapes mnésiques. Grâce à une technique d'imagerie cellulaire (catFISH), nous observons que l'apprentissage de la POC s'accompagne d'une augmentation de la convergence des informations odeur-goût au sein des neurones du NBL mais pas du CI, due à un recrutement d'une nouvelle population neuronale. Que l'approche soit systémique ou cellulaire, qu'elle intéresse un apprentissage aversif ou appétitif, nos études soulignent l'importance du NBL dans la mémoire olfactive alimentaire.

Mots-clés : aversion, goût, mémoire, odeur, préférence.

Abstract

To better understand the mechanisms involved in food olfactory learning, the neurobiological basis of conditioned odor aversion (COA) and the conditioned odor preference (COP) were investigated. We study the basolateral amygdala (BLA) and the insular cortex (IC), which receive olfactory, gustatory and visceral information. Using a pharmacological approach, we show that the BLA is involved in acquisition, consolidation and both recent and remote memory retrieval of COA. By contrast, the IC is not necessary to any of these memory phases. Using a cellular imaging technique (catFISH), we find that COP leads to an increase of odor-taste convergence onto individual neurons in the BLA, but not the IC, by means of the recruitment of a new population. Whether the approach is systemic or cellular and the learning is aversive or appetitive, our study highlights the importance of the BLA in food olfactory learning.

Key words: aversion, learning, memory, odor, preference, taste.

Liste des abréviations

AGC : Aversion Gustative Conditionnée

AOC : Aversion Olfactive Conditionnée

AMPA : Acide α -Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazole-Propionique

AOPG : Aversion Olfactive Potentialisée par le Goût

catFISH : cellular Compartment Analysis of Temporal activity by Fluorescent In Situ Hybridization

CI : Cortex Insulaire

GABA : Acide γ -amino-Butyrique

LiCl : Chlorure de Lithium

MCT : Mémoire à Court Terme

MLT : Mémoire à Long Terme

NPB : Noyau Parabrachial

NBL : Noyau Basolatéral de l'amygdale

NC : Noyau Central de l'amygdale

NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate

NTS : Noyau du Tractus Solitaire

PKM : Protéine Kinase M

POC : Préférence Olfactive Conditionnée

RC : Réponse Conditionnelle

RI : Réponse Inconditionnelle

SC : Stimulus Conditionnel

SI : Stimulus Inconditionnel

TSPA : Transmission Sociale d'une Préférence Alimentaire

Table des matières

Introduction.....	15
<i>A. De la mémoire et de ses multiples formes</i>	<i>15</i>
A.I. Des concepts philosophiques de la mémoire... à la neurobiologie des apprentissages	15
A.II. Des différents types de mémoire à long terme (MLT)	19
A.III. Des conditionnements associatifs classiques	20
<i>B. Des conditionnements alimentaires, de l'odeur, du goût et d'une séparation entre les deux non évidente.....</i>	<i>24</i>
B.I. La découverte d'un nouvel aliment	24
<i>B.I.1 Le goût</i>	<i>25</i>
<i>B.I.2. L'odeur</i>	<i>25</i>
<i>B.I.3. Le goût de l'odeur ... ou l'odeur du goût ?</i>	<i>26</i>
<i>B.I.4. Aversions et préférences innées</i>	<i>28</i>
B.II. Les conditionnements alimentaires	29
<i>B.II.1. Aversion gustative conditionnée (AGC).....</i>	<i>29</i>
<i>B.II.2. Aversion olfactive conditionnée (AOC).....</i>	<i>33</i>
<i>B.II.3. Aversion olfactive potentialisée par le goût (AOPG).....</i>	<i>36</i>
<i>B.II.4. Préférence olfactive conditionnée (POC).....</i>	<i>37</i>
<i>B.II.5. Conclusion</i>	<i>39</i>
<i>C. Bases neurobiologiques des conditionnements alimentaires</i>	<i>40</i>
C.I. Aversions gustatives conditionnées	40
<i>C.I.1. Voies neuroanatomiques des informations gustatives</i>	<i>41</i>
<i>C.I.2. Voies neuroanatomiques des informations viscérales</i>	<i>41</i>
<i>C.I.3. Substrat neurobiologique de l'AGC.....</i>	<i>43</i>
C.II. Aversions olfactives conditionnées.....	49
<i>C.II.1. Voies de traitement de l'information olfactive</i>	<i>49</i>
<i>C.II.2. Substrat neurobiologique de l'AOC.....</i>	<i>49</i>
C.III. Préférences olfactives conditionnées	55
<i>C.III.1 Bases neurobiologiques des POC.....</i>	<i>55</i>
<i>C.III.2. La POC : un modèle de convergence olfacto-gustative</i>	<i>57</i>
Objectifs de la thèse.....	65
Matériels et méthodes	73
<i>Animaux</i>	<i>73</i>

Procédures comportementales	73
<u>Aversions</u>	73
Aversion olfactive conditionnée.....	74
Aversion gustative conditionnée.....	75
<u>Préférence olfactive conditionnée</u>	75
Procédures chirurgicales	77
Drogues et procédures d'infusion	78
Procédures immunohistochimiques	79
<u>Fos et NeuN</u>	80
<u>CatFISH</u>	81
Procédures histologiques	83
Analyses statistiques	84
Chapitre 1 : Rôle du cortex insulaire dans l'aversion olfactive et l'aversion gustative conditionnée	87
<u>Résumé de l'article</u>	87
1 ^{er} article.....	89
Chapitre 2, 1^{ère} partie : rôle du noyau basolatérale de l'amygdale dans l'acquisition et le rappel de l'aversion olfactive conditionnée	93
<u>Résumé de l'article</u>	93
2 ^{ème} article	95
Chapitre 2, 2^{ème} partie : Le NBL dans la consolidation de l'AOC	97
<u>Résumé de l'article</u>	97
3 ^{ème} article	99
Chapitre 3 : Mise en place d'un modèle comportemental de préférence olfactive conditionnée et implication du noyau basolatérale de l'amygdale et du cortex insulaire	103
<u>Résumé de l'article</u>	103
4 ^{ème} article	105
Discussion générale	125
1- Les modèles comportementaux AOC et POC.....	128
2- Importance du NBL dans l'AOC et la POC.....	131
3- Implication et rôle du CI dans l'AOC et la POC.....	137
4- Interactions entre NBL et CI dans les apprentissages olfacto-gustatifs alimentaires.....	139

<i>5- Importance d'autres structures dans les apprentissages olfactifs alimentaires</i>	<i>140</i>
<i>6- Conclusions et perspectives</i>	<i>141</i>
Bibliographie.....	147
Annexe.....	171
Liste des communications.....	175

INTRODUCTION

Introduction

A. De la mémoire et de ses multiples formes

A.I. Des concepts philosophiques de la mémoire... à la neurobiologie des apprentissages

Intégrer les informations que nous expérimentons tous les jours ; conserver les éléments les plus importants ; les retranscrire si besoin est ; ces actes représentent une composante essentielle à la survie et l'amélioration des conditions de vie d'un être vivant et de ses proches. Que ce soit une abeille notant la position d'un champ de fleurs, un rongeur rencontrant une nourriture toxique ou un étudiant révisant avant des examens, la majeure partie du règne animal possède ces capacités que nous regroupons sous les concepts de mémoire et d'apprentissage. D'après Tulving « la mémoire est la capacité des systèmes nerveux à tirer bénéfice de l'expérience » et selon Delacour, l'apprentissage correspond à une « modification du comportement que l'on peut attribuer à l'expérience sensorielle passée de l'organisme » (Tulving, 1985 ; Delacour, 1978). La compréhension de ces phénomènes, de leurs mécanismes et bases neurobiologiques est aujourd'hui l'un des enjeux majeurs des neurosciences comportementales. Nous décrivons dans cette introduction les étapes qui ont permis d'imaginer les premiers concepts de mémoire(s) jusqu'aux bases neurobiologiques des mémoires qui nous intéressent spécialement, à savoir les conditionnements alimentaires olfactifs.

Ces concepts de mémoire ont longtemps appartenu au domaine de la philosophie. Il était difficile d'imaginer au moins jusqu'à la renaissance que le corps humain, ne parlons pas des animaux, puisse être doté de capacités qui lui permettent la réflexion, la mémoire et la conscience et que ces capacités soient d'origine biologique. On admettait communément que tout ceci provenait d'une source que nous ne pouvions concevoir, un monde différent, plus « divin ». Impossible donc d'en comprendre le fonctionnement par le biais de la médecine ou de la biologie. Pour cette raison, chercher des réponses à ces questions a longtemps été l'apanage des philosophes qui ont essayé depuis l'Antiquité de comprendre

comment nous pouvions garder le souvenir d'une expérience. L'Histoire a retenu que le premier à se pencher sur la question fut Platon au IV^{ème} siècle av. J.-C. D'après son concept du dualisme, le monde est divisé en deux, le monde physique et le monde des idées (Platon, -382). Au monde sensible dans lequel nous vivons, basé sur le physique, la chair et les sensations, il oppose le monde des idées, plus proche du divin. Selon lui les idées sont permanentes et l'âme y a accès. Malheureusement à la naissance nous perdons les souvenirs de ces idées, ce que l'on appelle la réminiscence. La mémoire apparaît alors comme une faculté qui permet d'approcher ces idées. Si Platon et son dualisme reste le courant le plus répandu durant l'Antiquité il est intéressant de noter que certains de ses contemporains avaient déjà des idées divergentes. Ainsi, tel un précurseur que l'Histoire n'a pas retenu, Aristippe attachait beaucoup d'importance aux sensations. Pour lui, les sens, en particulier l'odeur s'opposent aux idées pures par leur côté animal, bestial, instinctif (Aristippe choqua l'opinion publique en se promenant parfumé sur l'agora, le parfum étant un attribut réservé aux femmes). L'appréhension de la part animale de l'homme devient ainsi un moyen d'accéder à la connaissance (Onfray, 2006).

Les progrès de la médecine et de la biologie à partir de la renaissance jusqu'au XX^e siècle amenèrent des philosophes comme Descartes au XVII^e siècle à revoir les conceptions désuètes de l'Antiquité et du Moyen Age. Celui-ci est persuadé que notre corps est double : l'âme est une substance pensante (*res cogitans*), la matière est une substance étendue (*res extensa*) et si les deux sont indépendantes un lien se fait grâce à la glande pinéale qui doit être selon lui « le siège de l'âme ». En cherchant le moyen d'agir sur la substance pensante et d'améliorer sa connaissance, Descartes écrit *Les règles pour la direction de l'esprit*. Il y passe en revue les moyens d'accès à la connaissance, indiquant dans sa huitième règle : « Et d'abord nous remarquerons qu'en nous l'intelligence seule est capable de connaître, mais qu'elle peut être ou empêchée ou aidée par trois autres facultés, c'est à savoir, l'imagination, les sens, et la mémoire. » (Descartes, 1629). La mémoire est donc pour lui l'une des facultés humaines qui nous permet l'intelligence et nous différencie des animaux. Pourtant comme pour Platon cette mémoire appartient toujours au domaine des idées et son fonctionnement reste impénétrable.

Ce dualisme cartésien est à la base des courants où la psychologie devient scientifique et petit à petit de nouvelles théories sur la mémoire voient le jour. Pressenties dans les écrits de certains philosophes comme Maine de Biran à la fin

du XVIIIe siècle qui imagine plusieurs formes de mémoire (mémoire des représentations, mémoire des impressions et mémoire motrice ; Maine de Biran, 1799) ; comme Bergson à la fin du XIXe qui conçoit une mémoire « habitude » qu'il oppose à une mémoire « pure » (Bergson, 1896); ou encore dans certains travaux scientifiques menés chez l'Homme et le Rat (Ribot, 1881 ; Gall, 1822 ; Tolman, 1949), l'idée qu'il existe différents systèmes de mémoire commence à être prise au sérieux et les données empiriques de la médecine à partir du milieu du XXe siècle vont le confirmer.

Les premières études de neuropsychologie ont permis d'observer que des lésions de certaines zones du cerveau chez des patients victimes de traumatismes, d'opérations chirurgicales ou de syndromes lésionnels comme celui de Korsakoff entraînaient parfois des troubles comportementaux bien spécifiques. Le cas le plus connu est celui du patient H.M., opéré par les docteurs Milner et Scoville à la fin des années 50 (Milner & Scoville, 1956). En enlevant une zone précise du cerveau (l'hippocampe) dans les deux hémisphères du patient pour « soigner » un syndrome épileptique important, ils déclenchèrent chez cette personne une amnésie antérograde drastique et rétrograde légère. A partir du jour de l'opération, H.M. n'enregistra plus le moindre fait ou évènement, tout en gardant les mêmes capacités d'apprentissage concernant les jeux de réflexion, règles mathématiques et autres casse-têtes. Autre fait majeur, Milner et Scoville montrèrent que si H.M. ne gardait plus un souvenir de manière durable, sa capacité à retenir une ou plusieurs informations pendant quelques instants demeurait intacte. Pour la première fois de manière expérimentale, des chercheurs distinguèrent plusieurs formes de mémoires, possédant des bases neurobiologiques probablement différentes : mémoires à court terme (MCT) indépendantes de l'hippocampe et mémoires à long terme (MLT) différentes suivant qu'elles dépendent ou non de l'hippocampe (Milner, 1972). D'autres équipes se mirent alors à travailler sur cette dichotomie MCT-MLT. Ainsi Atkinson (Atkinson et Schiffrin, 1968) détermina que nous utilisons d'abord un registre sensoriel destiné à capter un grand nombre d'indices, pour la plupart visuels, provenant de notre environnement. Ces informations étaient ensuite maintenues dans une MCT appelée mémoire de travail permettant de retenir, manipuler et traiter un nombre restreint d'indices pendant quelques minutes en vue par exemple d'une opération complexe ou d'un jeu de mémoire. Enfin les informations étaient stockées dans la MLT pour une période indéfinie (Atkinson et Schiffrin, 1968). Ce modèle

sériel prédisait qu'en endommageant la MCT la MLT devait être perturbée, sans que l'inverse ne soit vrai. Pourtant des études cliniques ont prouvé que certains patients pouvaient avoir des troubles de MCT et une MLT intacte, ce qui conduisit Baddeley à améliorer le modèle d'Atkinson et Schiffrin. Il décomposa ainsi la mémoire de travail en plusieurs processus fonctionnant non plus en série mais en parallèle : un administrateur central auquel sont connectés une boucle phonologique et un « calepin visuo-spatial » (Baddeley et Hitch, 1974). Brièvement car la mémoire de travail n'est pas le sujet de cette thèse, l'administrateur central serait un système qui sélectionne, coordonne et contrôle les opérations de traitement, tandis que les systèmes « esclaves » que sont la boucle phonologique et le calepin visuo-spatial stockeraient les informations de manière spécifique en fonction de la nature du matériel (Baddeley et Hitch, 1974). Ainsi une lésion cérébrale peut atteindre chacun des composants de traitement de la mémoire de travail et donc entraîner des déficits spécifiques suivant le composant touché.

Faisons un aparté pour décrire un autre courant de recherches qui se développe alors en parallèle et tient aujourd'hui une place prépondérante dans les neurosciences modernes. Travaillant non pas sur les différentes formes de mémoires et les structures cérébrales qui les sous tendent, il est encore un peu tôt pour cela, Ramon y Cajal va être le premier à aborder le problème des bases moléculaires et cellulaires à l'origine des phénomènes cognitifs. Il établit dans sa *théorie du neurone* que ce sont des neurones qui représentent la base cellulaire du cerveau (ce qui lui valut le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1906). Ces neurones enchevêtrés ne se touchent jamais et communiquent entre eux par le biais des synapses. De cette communication naissent les phénomènes cognitifs et parmi eux celui qui nous intéresse le plus dans cette thèse : la mémoire. Une seconde avancée majeure dans le fonctionnement des neurones et donc des processus mnésiques vient des travaux de Donald Hebb, psychologue et neuropsychologue canadien. Ses découvertes à propos des réseaux de neurones ont beaucoup fait avancer les neurosciences cognitives. Il écrit en 1949 la règle de base de la communication entre neurones aujourd'hui encore considérée comme un postulat : « lorsque l'axone d'un neurone A est suffisamment près d'un neurone B pour l'exciter et le fait décharger de manière répétée ou persistante, un certain lien physique ou changement métabolique s'établit dans l'une ou les deux cellules de telle manière que l'efficacité de A en tant qu'excitatrice de B augmente » (Hebb, 1949). La mémoire pourrait donc

trouver son origine au niveau cellulaire dans des changements d'efficacité synaptiques. Nous verrons plus loin dans la thèse l'importance de cette règle de Hebb. L'utilisation d'animaux en tant que sujets d'études pour des approches interventionnelles a ensuite beaucoup apporté à la compréhension de ces différents systèmes de mémoire et leur organisation. Plus particulièrement nombreux de travaux utilisant des approches lésionnelles ou pharmacologiques ont permis de dresser une taxonomie des systèmes de mémoires à long terme et les structures cérébrales qui les sous tendent (Squire, 2004). D'après Squire, ces MLT sont divisées en deux grands groupes, les mémoires déclarative et non déclarative. Etant donné qu'il est difficile de parler de « déclaratif » pour un animal nous nous référerons aux termes adoptés plus récemment, à savoir respectivement les mémoires explicites et les mémoires implicites.

A.II. Des différents types de mémoire à long terme (MLT)

Les mémoires explicites regroupent les mémoires qu'en tant qu'humains nous pouvons verbaliser : connaissances, faits ou concepts, ce sont les mémoires dites épisodique et sémantique. La première est une mémoire centrée sur l'individu qui permet le souvenir de contextes, d'états émotionnels et d'événements vécus par une personne : « j'ai passé le dimanche dernier à la plage, il faisait beau et chaud ». La seconde est la mémoire des faits et connaissances nécessaires à l'utilisation du langage et correspond au savoir organisé que nous possédons pour les mots, les concepts, les symboles non verbaux et leurs significations (Tulving, 1972). C'est la mémoire qui nous permet de définir l'idée de vacances ou de nous rappeler que 1515 correspond à la victoire de François Ier à Marignan. L'exploration neuropsychologique du patient H.M. a montré que la lésion de l'hippocampe entraînait d'importantes perturbations de la mémoire déclarative ou explicite, résultats confirmés par l'observation d'enfants nés sans hippocampe. Ceux-ci présentaient des déficits sévères de cette mémoire et plus particulièrement de la mémoire épisodique (Vargha-Khadem et al., 1997). Chez l'animal, celui-ci ne verbalisant pas, nous parlons de mémoire de référence à la place de mémoire déclarative. Cette mémoire de référence met en relation des ensembles de stimuli pour former la représentation complexe d'une situation ou d'un environnement. Cette mémoire semble aussi reposer sur l'intégrité de l'hippocampe (Mingaud et al., 2007).

A l'opposé de ces mémoires explicites, Squire situe les mémoires basées sur des associations simples de stimuli, menant à des habiletés ou des automatismes (Figure 1). Ainsi savoir faire du vélo résulte d'un apprentissage procédural, parfois long, et ne peut être verbalisé. En décrivant à une tierce personne comment faire du vélo, cette dernière ne saura pas nécessairement faire du vélo sans s'être au préalable entraînée. Cette mémoire implicite dite procédurale dans ce cas, dépend en grande partie du striatum, l'une des structures primordiales dans la mise en place des mouvements (pour revue, voir Packard et Knowlton, 2002). Retirer son doigt après l'avoir posé sur une plaque de cuisson brûlante est un réflexe qui fait aussi partie des mémoires implicites. Ce type de mémoire appelé conditionnement associatif, est présent chez quasiment toutes les formes de vies animales, et résulte de l'association de plusieurs stimuli, association qui entraîne une réponse de l'individu. L'amygdale par exemple joue ici un rôle majeur dans ces apprentissages qui possèdent souvent une connotation émotionnelle (Ledoux, 2000).

Du fait de leur caractère en apparence très simple les conditionnements associatifs ont beaucoup servi de modèles d'études pour comprendre les bases comportementales et neurobiologiques de la mémoire.

A.III. Des conditionnements associatifs classiques

La découverte du conditionnement associatif revient au scientifique russe Pavlov à la fin du XIXe (ses écrits n'ayant été publiés en anglais qu'en 1927). Au cours d'expériences chimiques sur la salive de ses chiens, il remarqua que ceux-ci salivaient avant même de recevoir leur nourriture. De fil en aiguille il en vint à comprendre qu'il était possible de provoquer chez eux un réflexe « conditionnel » en présentant chaque fois un son de clochette suivie d'une boulette de viande. Après plusieurs essais les animaux n'avaient plus besoin de la boulette de viande pour saliver, le son suffisant apparemment à évoquer la viande. De là naquirent les concepts de conditionnement et par la suite avec les travaux de Watson puis de Skinner qui découvrit le conditionnement opérant ou instrumental, furent établies les bases du « behaviorisme ». Les conditionnements classique et opérant (ou instrumental ou skinnerien) diffèrent sur au moins un point capital : alors que le conditionnement classique entraîne une réponse automatique de l'individu lorsqu'il est confronté à un stimulus, le conditionnement opérant entraîne pour sa part une

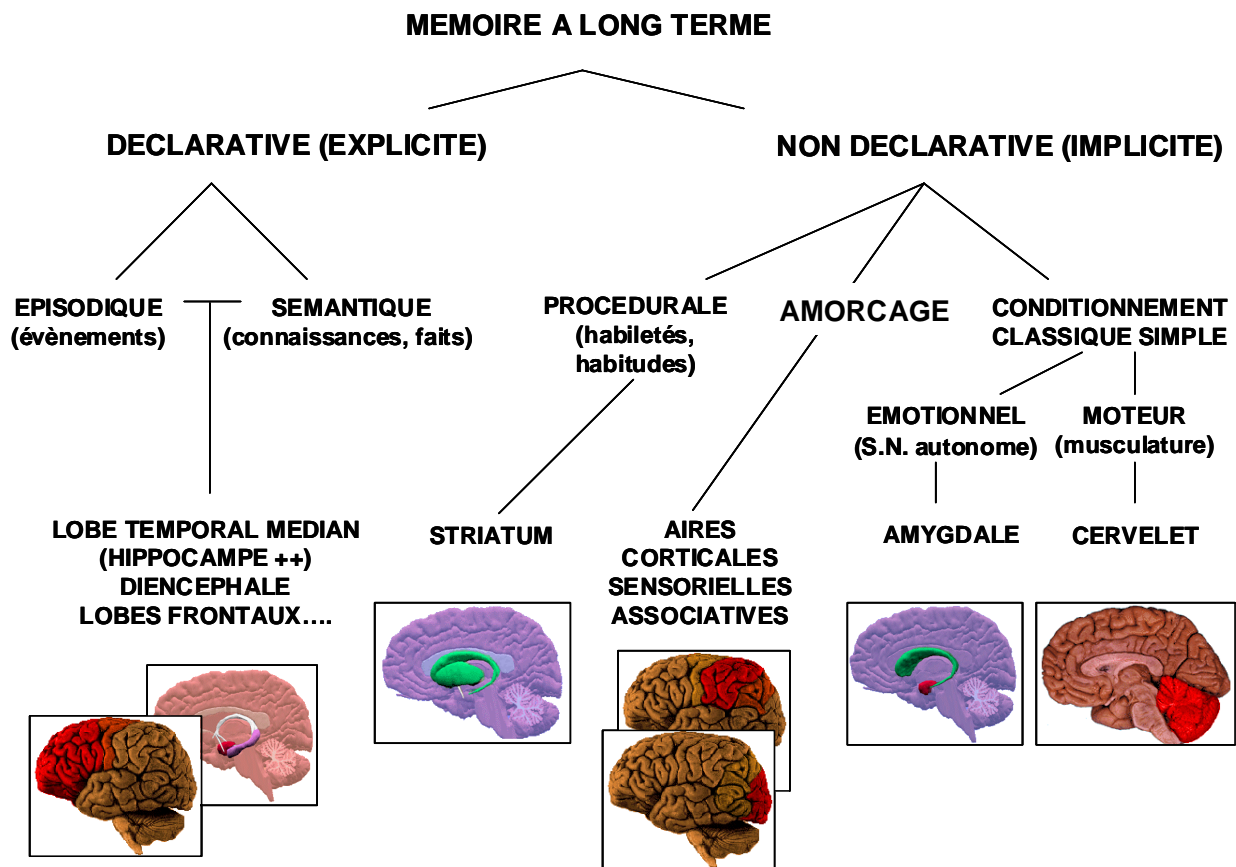


Figure 1. Taxonomie des systèmes de mémoires à long terme montrant les différentes sous catégories de mémoires et les principales structures cérébrales sous-tendant ces mémoires (D'après Squire, 2000 ; Jaffard, 2004).

réponse volontaire de l'individu (Skinner, 1938). Cette différence entre automatique et volontaire est importante dans notre cas et nous aurons le temps d'y revenir plus loin.

Les premières études permirent de déterminer que ces conditionnements associatifs, qu'ils soient classiques ou opérants, reposent sur des mécanismes associatifs entre deux stimuli ou plus. Un premier stimulus, initialement neutre c'est-à-dire n'entraînant aucune réponse chez l'individu, est associé à un stimulus inconditionnel (SI) qui lui provoque systématiquement une réponse inconditionnelle (RI). Le stimulus neutre se transforme alors en stimulus conditionnel (SC) et induit, lorsqu'il est présenté seul, une réponse conditionnelle (RC). Dans l'expérience de Pavlov, exemple probant de conditionnement classique, le son représentait le stimulus neutre devenu conditionnel, la boulette de viande le SI et la salivation la RI devenue RC. L'apparition de cette RC repose sur trois processus principaux qui se succèdent dans le temps : l'acquisition, la consolidation et le rappel du conditionnement (Figure 2). Par facilité, nous utiliserons ici le terme de « rappel » alors qu'il serait peut-être plus judicieux d'utiliser celui de « reconnaissance », rappel étant normalement employé pour le rappel conscient chez l'homme. Lors de l'acquisition, l'animal capte les stimuli, les traite indépendamment, puis les met en relation et réalise une association entre eux. L'association SC-SI est ensuite intégrée et stockée de manière durable, c'est la consolidation. Deux types de consolidation existent. La première est dite synaptique ou cellulaire et permet de passer d'une MCT dite « labile » à une MLT dite « stable ». Cette stabilisation progressive de la mémoire semble dépendre de phénomènes de synthèse de nouvelles protéines qui vont permettre de consolider la communication entre synapses (Dudaï, 2004). Il existe aussi une consolidation dite de système qui correspond à une réorganisation avec le temps des structures cérébrales impliquées dans le stockage et/ou le rappel de la mémoire (pour revue : Frankland et Bontempi, 2005). Contrairement à la consolidation synaptique qui se met en place dans les quelques heures qui suivent l'acquisition, la consolidation de système nécessite plusieurs semaines (voire plusieurs années chez l'Homme ; pour revue : Dudaï, 2004 ; Frankland et Bontempi, 2005). Il est possible que les troubles mnésiques de H.M., le patient cité plus haut, proviennent d'une altération des processus qui permettent la consolidation, qu'elle soit synaptique ou systémique. Enfin lors du test et de la présentation du SC, le processus de rappel est mis en jeu afin de provoquer la RC. Lorsque ce rappel est

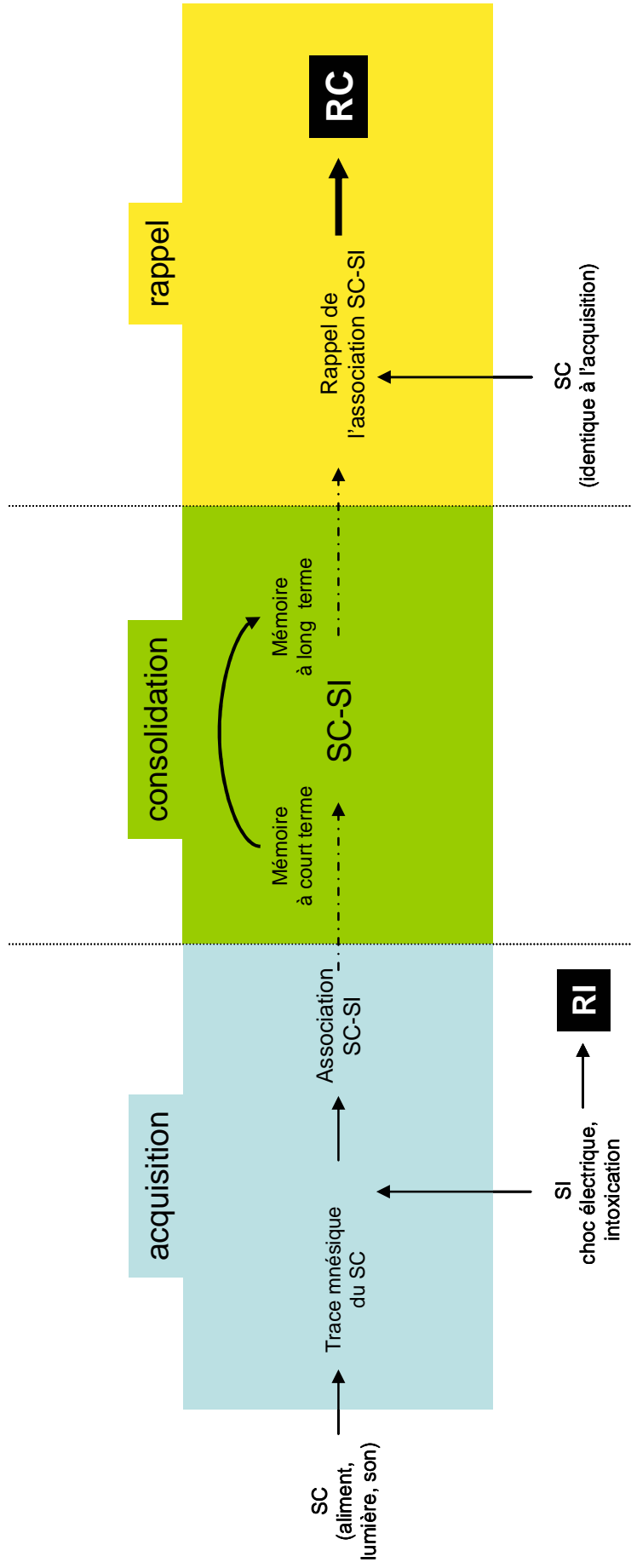


Figure 2. Représentation schématique des différents processus à la base du conditionnement classique, de la présentation du stimulus conditionnel (SC) à la réponse conditionnelle (RC). SI : stimulus inconditionnel ; RI ; réponse inconditionnelle.

effectué après 2 ou 3 jours, on parle de mémoire récente, tandis que s'il a lieu plusieurs semaines après, il s'agit d'une mémoire ancienne. Ces deux types de rappels paraissent d'ailleurs faire appel à des substrats neurobiologiques différents mais nous aurons le temps d'y revenir plus loin.

Jusqu'au milieu du XXe siècle on a pensé que la condition nécessaire pour établir cette association SC-SI était la contiguïté temporelle et spatiale des deux stimuli, en d'autres termes que les deux stimuli devaient nécessairement être assez proches dans le temps et l'espace pour ne pas sortir du champ réceptif de l'animal conditionné. L'idée fut modifiée lorsque Rescorla en 1967 montra que la contiguïté était suffisante mais pas nécessaire. Il introduisit alors l'idée de contingence, un terme emprunté aux probabilités et signifiant littéralement la « possibilité qu'une chose arrive ou n'arrive pas, (opposée à nécessité) ». Ainsi la probabilité qu'un SI soit toujours précédé du même SC et inversement que ce SC soit toujours suivi de ce même SI équivaut à une contingence maximale et induit plus facilement une réponse conditionnelle (Rescorla et Wagner, 1972).

Un autre facteur qui permet de remettre en cause la contiguïté comme condition nécessaire au développement d'un conditionnement associatif est justement le type de conditionnement induit et plus particulièrement le type de stimulus utilisé. Lorsque des animaux apprennent à développer une peur conditionnée à un son, une lumière ou un contexte spécifique, l'intervalle inter stimuli doit être minime, de l'ordre de quelques minutes afin que se crée une association. Mais Garcia et ses collaborateurs dans les années 1950 commencèrent à travailler sur des modèles de conditionnements alimentaires aversifs, qui reposaient donc non plus sur des stimuli externes comme des indices visuels ou auditifs mais sur une sensorialité différente, internalisée lors de l'apprentissage, le goût.

B. Des conditionnements alimentaires, de l'odeur, du goût et d'une séparation entre les deux non évidente

B.I. La découverte d'un nouvel aliment

La reconnaissance d'un aliment se fait sur la base de ses caractéristiques sensorielles telles que l'odeur, le goût, la texture ou l'aspect visuel. Comparé à l'animal, chez l'Homme d'autres composantes interviennent dans la mémoire des

aliments comme la culture, la religion, ou l'éducation mais nous n'en parlerons pas ici. Le propos de cette thèse concernant les conditionnements alimentaires, nous nous sommes focalisés sur les deux principales caractéristiques chimiosensorielles susceptibles de former une représentation de cet aliment, à savoir l'odeur et le goût.

B.I.1 Le goût

Le goût est une sensorialité qui se rencontre exclusivement dans l'alimentation. Il repose chez les Mammifères sur l'existence de chimiorécepteurs présents exclusivement sur la langue et capables de détecter différentes molécules chimiques dont la conformation va définir une sensation gustative spécifique. Depuis les travaux au XIXe siècle du physiologiste Adolph Fick on reconnaît quatre saveurs primaires ou fondamentales qui seraient liées à quatre types de récepteurs sensoriels et quatre localisations sur la langue : le sucré, le salé, l'acide et l'amer. On ajoute aujourd'hui une cinquième saveur, encore mal définie, appelée umami (signifiant en japonais *savoureux*) identifié en 1908 par un scientifique japonais, et qui s'apparente à la saveur du glutamate. Cette théorie de localisation des saveurs sur la langue a toutefois été remise en cause au début du XXe siècle, des études montrant que des sujets qui reçoivent une goutte de substance salée sur la zone supposée sucrée de la langue sont capables de la reconnaître comme salée (Hanig, 1901 ; pour revue lire Reed, 2006). Les travaux de Annick Faurion, montrant que le goût ne se résume pas à quatre ou cinq zones de la langue mais à des interactions complexes, font aussi références (Faurion et al., 1998 ; Froloff et al., 1996, 1998).

L'anatomie des voies gustatives est aujourd'hui relativement bien connue et sera détaillée plus loin dans la partie dédiée aux bases neurobiologiques des conditionnements alimentaires.

B.I.2. L'odeur

Selon l'Académie Française, La définition d'une odeur est « la sensation que produisent sur l'odorat les émanations des corps », l'odorat ou l'olfaction étant donc la faculté sensorielle qui permet la détection, la reconnaissance et la discrimination des odeurs. A la différence du goût, les odeurs ne possèdent pas seulement une composante alimentaire. Elles sont à la base de comportements très variés chez l'Homme et l'animal: reconnaissance d'individus, de territoire, évitement de

prédateur, communication entre individus chez les insectes sociaux et orientation spatiale chez certaines espèces migratrices par exemple. Chez l'Homme, animal considéré comme microsmate c'est-à-dire possédant un odorat peu développé, les odeurs sont souvent associées à des mémoires épisodiques très fortement chargées émotionnellement : souvenirs d'enfance, de voyages qui font ressurgir des images précises dans l'esprit.

La reconnaissance des odeurs quelles soient liées à un aliment ou un autre individu se fait grâce à des chimiorécepteurs placés différemment suivant les espèces, par exemple sur les antennes chez les insectes ou dans la cavité nasale chez les mammifères. Il existe plusieurs voies olfactives chez les mammifères (Figure 3). L'odeur respirée dans l'air induit une stimulation dite orthonasale. Elle ne constitue pas comme le goût une composante intrinsèque de l'aliment consommé et est appelée odeur distale. Lorsque l'aliment est ingéré, l'odeur devient alimentaire et une seconde manière de stimuler le système olfactif est sollicitée. C'est la voie rétronasale qui intervient lorsque l'élément olfactif atteint le fond de la bouche et remonte vers la cavité nasale. Nous parlons alors d'odeur proximale (Small et al., 2005 ; Shepherd, 2006). S'il est reconnu que ces deux voies peuvent engendrer des sensations olfactives différentes (respirer l'odeur d'un vin dans un verre ou le mettre en bouche en aspirant de l'air révèle des odeurs et arômes parfois bien différents), le rôle joué par ses différentes voies olfactives dans les apprentissages alimentaires reste à éclaircir.

B.1.3. Le goût de l'odeur ... ou l'odeur du goût ?

Dans un contexte naturel, il est extrêmement rare de trouver des substances purement gustatives ou olfactives. Chaque aliment ou même corps organique présente des caractéristiques olfactives et gustatives. Le mélange de ces deux éléments, odeur et goût correspond à ce que l'on appelle une saveur (Small et Prescott, 2005). Lorsque nous parlons du goût d'une fraise, nous avons tendance à faire l'amalgame entre goût et saveur, la fraise n'ayant qu'un goût sucré. La saveur est l'association d'un goût parmi les cinq recensés et d'une odeur parmi la multitude de molécules odorantes que nous sommes capables de percevoir. Un tel mélange odeur/goût crée ainsi une infinité de possibilités auxquelles nous sommes régulièrement confrontés, à condition d'être un tant soit peu curieux. Lors de la consommation d'un plat, les odeurs, les goûts et les mélanges des deux peuvent être

nouveaux ou familiers, et cette consommation s'accompagner d'une sensation de plaisir ou le cas échéant rendre malade. Si ce plat était nouveau mais toxique par exemple : de l'odeur, du goût ou du mélange, lequel va réveiller un souvenir de la précédente dégustation et permettre d'éviter un nouvel empoisonnement ? Qui de l'odeur ou du goût est le plus à même de jouer le rôle de SC pour s'associer avec un malaise gastrique jouant le rôle de SI et laisser une trace mnésique dans le cerveau ?

Nous allons maintenant voir comment à partir d'un goût, d'une odeur ou d'une flaveur nous pouvons induire différents conditionnements alimentaires chez un rat.

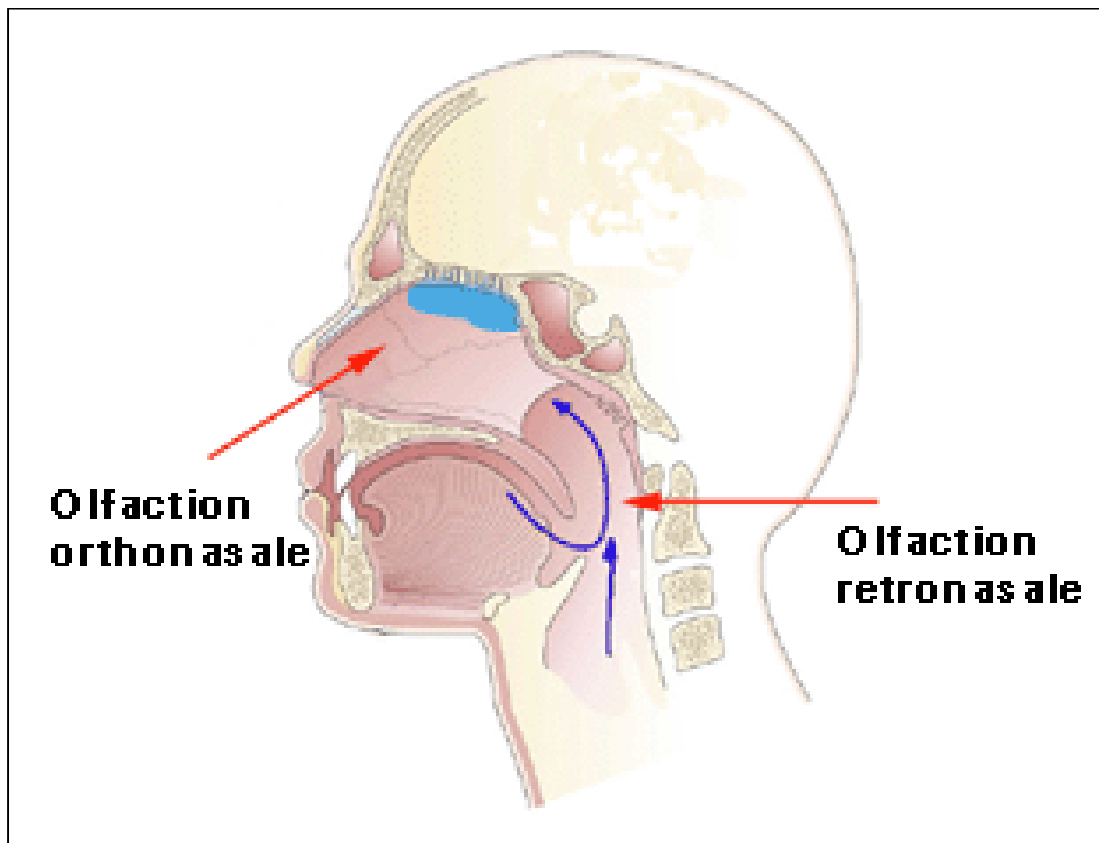


Figure 3. Représentation schématique des voies olfactives chez l'homme : la voie orthonasale qui concerne les odeurs distales provenant de l'extérieur et la voie rétronasale qui concerne les odeurs issues de la cavité buccale donc internes.

B.I.4. Aversions et préférences innées

Prenant ici le mot « inné » dans son étymologie latine (*innatus* : présent dès la naissance), nous savons aujourd'hui qu'il existe chez l'Homme comme chez l'animal des goûts qui semblent aversifs ou appétitifs dès la naissance. Ainsi un aliment au goût amer est généralement évité lors des premières années chez des espèces telles que l'homme, les grands singes ou le rat. Par exemple, lors de la présentation de quinine, au goût amer notoire, on observe une aversion flagrante se manifestant chez les nouveaux nés humains ou les primates par des mimiques qui sont jugées de dégoût et de répulsion et chez le rat par un évitement de la solution contenant la quinine (Steiner et al., 2001). L'une des théories possibles pour expliquer ce comportement d'évitement des substances amères est la présence dans la nature d'un grand nombre de plantes au goût amer qui en y regardant de plus près se révèlent souvent vénéneuses. Inversement, il apparaît une préférence innée pour tout goût sucré ou salé, tant que la concentration n'est pas excessive. Cette préférence se manifeste par exemple par des protrusions de la langue ou des sourires chez le nouveau-né humain qui expérimente le goût sucré ou salé et une tendance à consommer plus de solution sucrée ou salée chez les rats (Steiner et al., 2001 ; Myers et Sclafani, 2006).

Il n'existe pas d'odeur aversive ou appétitive de manière « innée » chez l'Homme, (Schaal, 2000). Toutefois, dans un contexte non alimentaire, certaines espèces animales comme les moutons ou les rats semblent capables de reconnaître et s'éloigner d'une source d'où émanent des effluves de prédateurs, ce dès le plus jeune âge et sans jamais avoir été confrontés à cette odeur (Pfister et al, 1989 ; Takahashi et al., 2005). De plus, dans un contexte alimentaire, des aversions ou préférences olfactives ont été observées à la naissance mais elles résultaient en fait d'apprentissages in utero. Ainsi, des mères enceintes que l'on encourage à consommer du jus de carotte en quantité ou des produits anisés, vont accoucher d'enfants qui présenteront une préférence pour la carotte ou l'anis (Mennella et al., 2001 ; Schaal et al., 2000). De façon identique, des rates en fin de gestation exposées quotidiennement à du citrus (essence de citron) ou de l'ail donnent naissance à des ratons qui montrent des préférences olfactives pour les produits citronnés ou aillés respectivement (Le Magnen et Tallon, 1968 ; Hepper, 1988).

Inversement, l'ingestion d'ail par des rates gestantes suivi d'une intoxication va engendrer une aversion pour l'odeur d'ail chez les ratons (Gruest et al., 2004). Ces préférences et aversions représentent en fait des apprentissages ou conditionnements alimentaires très précoces.

B.II. Les conditionnements alimentaires

Malgré certaines orientations « innées » en particulier pour les goûts, nos préférences et aversions vont essentiellement résulter de l'apprentissage. Les conditionnements alimentaires font partie des apprentissages basiques et présents dans quasiment l'ensemble du règne animal, depuis les invertébrés jusqu'aux humains. En effet la recherche de nourriture, en particulier d'aliments sains et bénéfiques pour la santé passe souvent par la rencontre de produits qui peuvent s'avérer toxiques voire mortels. Reconnaître et éviter les aliments nocifs est donc essentiel à la survie. En milieu naturel, les exemples de mémoire liée à l'alimentation sont nombreux. Des coyotes intoxiqués après avoir mangé une carcasse empoisonnée évitent de consommer ensuite les proies qui s'apparentent à cette carcasse (Hankins et al, 1973). Un autre exemple est celui des mantes religieuses qui se nourrissent de vers présents sur différentes plantes, en particulier l'herbe à ouate. Cette plante sécrète un poison violent que les vers incorporent sans en être affectés. En dévorant un de ces vers, la mante s'empoisonne, vomit et apprend à rejeter ces vers sur des indices visuels (Berenbaum et Miliczy, 1983). Ces exemples à connotation négative sont à opposer à des apprentissages alimentaires positifs : c'est le cas par exemple des faons qui apprennent rapidement, en quelques tentatives de dégustation, à préférer les végétaux qui présentent le plus de carbohydrates afin de leur assurer une nourriture plus énergétique en toute saison (Verheyden-Tixier et al., 1998).

B.II.1. Aversion gustative conditionnée (AGC)

Les AGC représentent peut être la forme de mémoire alimentaire la plus répandue parmi les espèces animales puisque d'un point de vue évolutif, elles apparaissent en même temps que les premiers reptiles et sont conservées dans l'ensemble de la classe des mammifères (Paradis et Cabanac., 2004). Cette généralisation de l'AGC parmi les espèces animales se fait aussi au point

développemental. Il est ainsi possible d'induire une AGC pour un goût sucré (saccharine) dès le premier jour post-partum (Mickley et al., 1998). Cette capacité à développer une AGC semble d'ailleurs ne pas devoir diminuer avec le vieillissement comparé à d'autres formes de mémoire (Moron et al., 2002).

L'AGC résulte de l'association unique d'un goût non aversif, sucré ou salé en général, et nouveau (le SC), présenté généralement dans une solution aqueuse (ou parfois intra oralement), avec un malaise gastrique (le SI) induit par l'injection intra-péritonéale d'un agent émétique, généralement le chlorure de lithium (LiCl ; Garcia 1974 ; Palmerino et al., 1980). Ce malaise gastrique se traduit par une série de symptômes comme des diarrhées, des douleurs abdominales et des vomissements (Meachum & Bernstein, 1990). Lorsque le goût en solution est représenté à l'animal quelques temps après, une baisse significative de la consommation de cette solution est observée. Cette diminution traduit donc une AGC qui peut perdurer jusqu'à plusieurs mois après l'acquisition. Ce type d'apprentissage porta un temps le nom de « Sauce-béarnaise syndrome » (Seligman et Hager, 1972). Si des chocs électriques sur les pattes de l'animal sont utilisés comme SI à la place de l'intoxication aucune AGC ne se développe indiquant une « prédisposition » à l'association des stimuli intéroceptifs : le goût et le message viscéral douloureux (Garcia et al., 1968).

Trois facteurs sont déterminants pour induire une AGC efficace. Le premier est la nouveauté du goût. Tous les animaux omnivores ont tendance à présenter une néophobie pour un nouvel aliment. Cette peur de la nouveauté va disparaître après la présentation répétée de ce goût (Domjan et al., 1976 ; Best et al., 1978). Ainsi le goût acquiert un caractère familier, la nourriture est considérée comme saine et il s'avère alors difficile de l'associer à un SI négatif pour provoquer une AGC. C'est le phénomène d'inhibition latente décrit par Lubow (Lubow et Moore, 1959).

Le second facteur est l'intensité des stimuli. En effet plus le goût nouveau sera concentré plus l'aversion sera forte et durable (Nowlis et al., 1974). De même, de la concentration du SI va dépendre l'aversion. Que le SI soit un traitement pharmacologique comme le LiCl ou l'apomorphine injectés intra-péritonéalement (Palmerino, 1980 ; Garcia & Koelling, 1966), une irradiation par rayon gamma ou X (Garcia, 1956 ; Smith & Roll, 1967), plus l'intensité du malaise est forte plus l'aversion est grande. Ces irradiations, ou parfois directement le cancer contre lequel elles sont utilisées, peuvent constituer un SI puissant et créer d'importantes aversions chez certains patients traités (pour revue voir Bernstein, 1999).

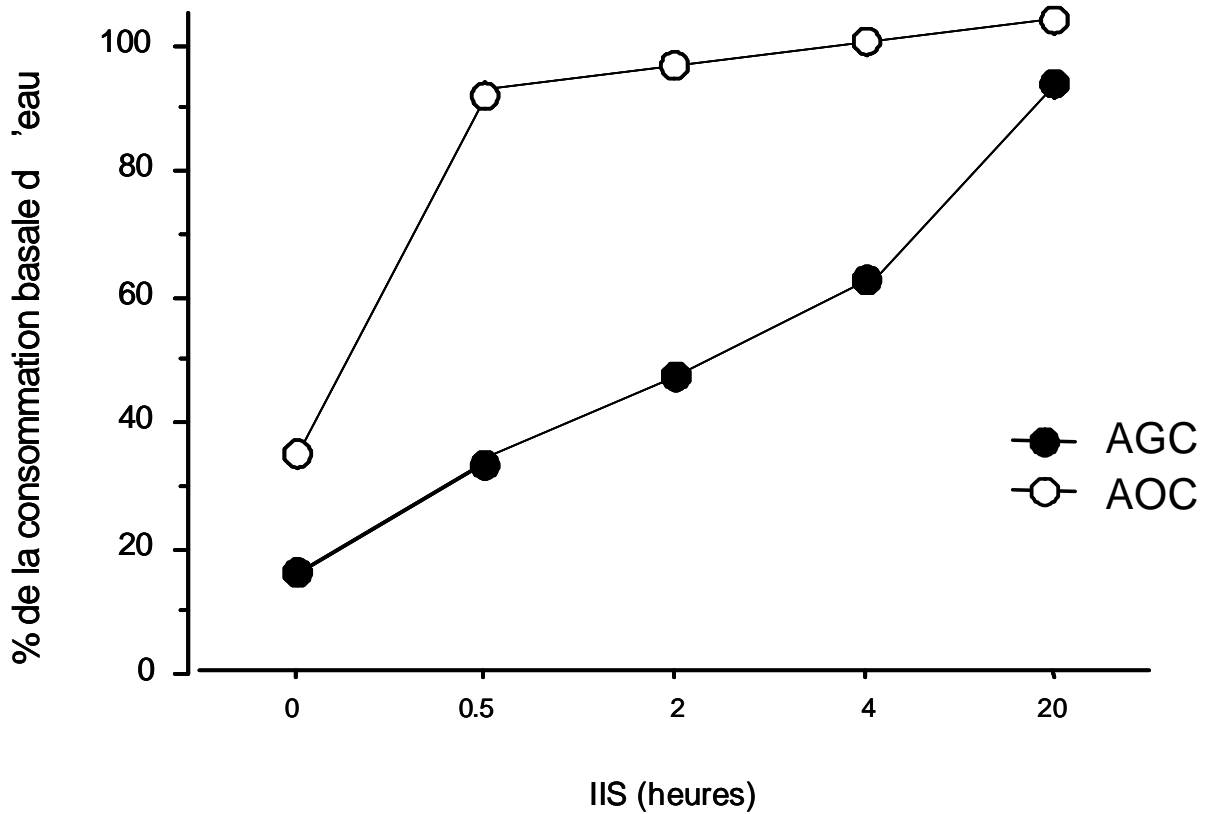


Figure 4. Aversions pour le goût (AGC) et l'odeur présentée en distal (AOC) en fonction de l'intervalle entre la présentation du stimulus chimiosensoriel et le malaise (adaptés de Palmerino et al., 1980; Ferry et al., 1996). Intervalle inter-stimuli : IIS. Plus le % de consommation est faible, plus l'aversion est forte.

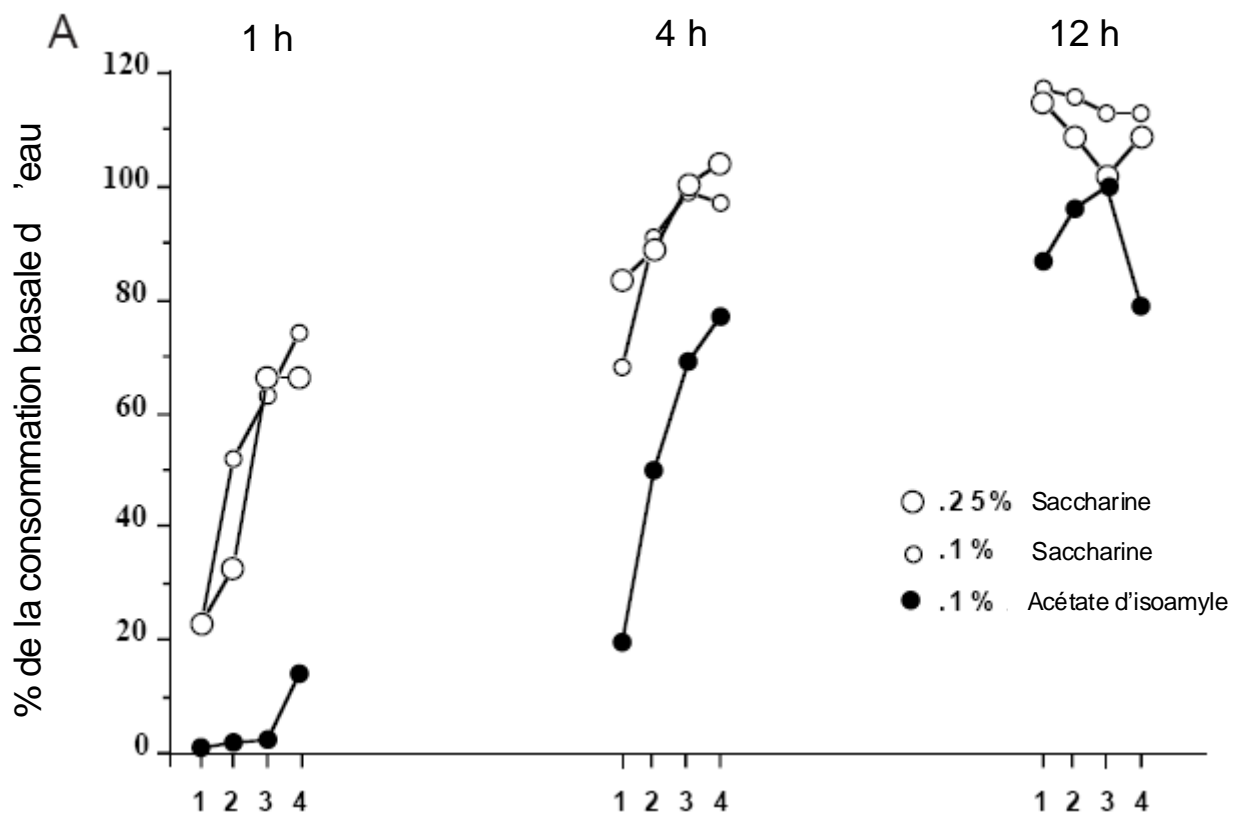


Figure 5. Aversions pour la saccharine et l'acétate d'isoamyl exprimées en pourcentage de la consommation basale d'eau pour les 4 tests en fonction de l'IIS (d'après Slotnick et al., 1997).

Enfin le dernier facteur, et peut être celui qui revêt le plus d'importance est l'intervalle inter stimuli ou IIS. Les conditionnements classiques associatifs comme celui de la peur conditionnée reposent habituellement sur un IIS très court de l'ordre de quelques secondes (Abrams & Kandel, 1988 ; pour revue voir Mackintosh, 1991). Passé ce délai, il n'est quasiment plus possible d'induire une association entre les deux stimuli. L'AGC représente à ce titre une exception dans le domaine des conditionnements car même avec un IIS de plusieurs heures, il se forme une aversion pour le goût, aversion inversement proportionnelle à l'IIS (Figure 4). Ceci est probablement dû au fait qu'il est primordial pour un animal d'apprendre en une seule fois et retenir le plus longtemps possible ce qui est nocif pour lui, « ce qui ne tue pas rend plus fort » (Nietzsche, 1888). D'un point physiologique ce délai semble logique lorsqu'on considère que les conséquences négatives de l'ingestion d'une substance néfaste se font rarement ressentir immédiatement. Cette caractéristique de l'AGC a d'ailleurs fait l'objet d'une importante polémique jusqu'au début des années 80, la communauté scientifique considérant qu'un tel intervalle de temps entre le moment de l'ingestion et le malaise gastrique ne pouvait pas correspondre à un conditionnement pavlovien.

B.II.2. Aversion olfactive conditionnée (AOC)

Depuis les premières études de conditionnements alimentaires, l'AOC est longtemps apparue difficile à mettre en place contrairement à l'AGC (Figure 4). Dans la grande majorité de ces études, l'AOC reposait sur l'association d'une odeur présentée autour de la solution à boire (eau sans goût) et d'un malaise gastrique (Palmerino et al., 1980 ; Rusiniak et al., 1979). Dans ces conditions il était possible d'induire une aversion pour l'odeur seulement si l'IIS se trouvait suffisamment court (inférieur à quelques minutes). Pour ces raisons ce modèle a été moins étudié, ou jugé moins pertinent que l'AGC pour investiguer les bases comportementales et neurobiologiques de la mémoire.

Ces idées survécurent jusqu'au milieu des années 90 lorsque Slotnick et collaborateurs développèrent une AOC en tout point comparable à une AGC (Figure 5). Avec une seule association entre odeur et malaise gastrique et un IIS dépassant largement l'échelle de la minute, il réussit à provoquer une AOC puissante et durable chez des rats (Slotnick et al., 1997). La différence majeure entre son paradigme expérimental et les précédents résidait dans le fait qu'il mélangeait l'odeur à l'eau

(0.1% acétate d'isoamyl; odeur de banane) lors de l'acquisition et du rappel du conditionnement provoquant ainsi une « ingestion » de l'odeur par les animaux. Utilisant des animaux bulbectomisés (c'est-à-dire sans bulbe olfactif et donc sans odorat), ils contrôlèrent que la solution était reconnue sur ses propriétés olfactives et non gustatives.

Si ces travaux indiquaient que l'ingestion de l'odeur était primordiale pour l'AOC, ils ne démontraient pas clairement le mécanisme et en particulier l'importance des voies olfactives stimulées. Utilisant un protocole et une cage de conditionnement différents de ceux utilisés classiquement, de récents travaux ont permis de le faire (Chapuis et al., 2007). Les animaux sont d'abord habitués à passer le museau dans un port à odeur (n'émettant aucune odeur) afin d'avoir accès à une pipette d'eau (Figure 6A). Le jour du conditionnement les rats reçoivent dans le port l'odeur de banane (odeur distale) et dans la pipette soit de l'eau normale soit de l'eau odorisée à la banane (0.01% acétate d'isoamyl; odeur proximale). Certains animaux sont donc conditionnés avec l'odeur distale seulement, d'autres avec l'odeur en distale et proximale. Alors que les animaux conditionnés avec l'odeur distale développe une AOC seulement si le LiCl est injecté dans les 5 minutes qui suivent la session (et pas une heure plus tard), ceux conditionnés avec l'odeur distale et proximale supporte un IIS pouvant aller jusqu'à deux heures (Figure 6B). Il est intéressant de noter que lors des tests de rappel, le mode de présentation de l'odeur n'a pas d'importance : les animaux conditionnés avec une odeur distale/proximale ont tous une AOC importante qu'ils soient testés de façon distale (seule) ou distale/proximale. L'AOC reste aussi 50 jours après le conditionnement (Chapuis et al., 2007). Ces résultats confirment donc que l'ingestion de l'odeur via une solution odorisée est déterminante pour induire une AOC efficace et durable. Ils suggèrent que l'activation des voies olfactives orthonasale et rétronasale est nécessaire pour un conditionnement optimal et que l'activation de la voie orthonasale est suffisante pour le rappel. Ces conditionnements sont en partie instrumentaux. Il serait donc intéressant d'évaluer si ces résultats sont généralisables dans des conditions expérimentales plus simples, c'est-à-dire dans la cage d'élevage et avec un accès facile à la boisson. Cela permettrait alors de comparer les performances d'animaux en AOC et en AGC et de cette manière les bases neurobiologiques qui sous-tendent les deux conditionnements.

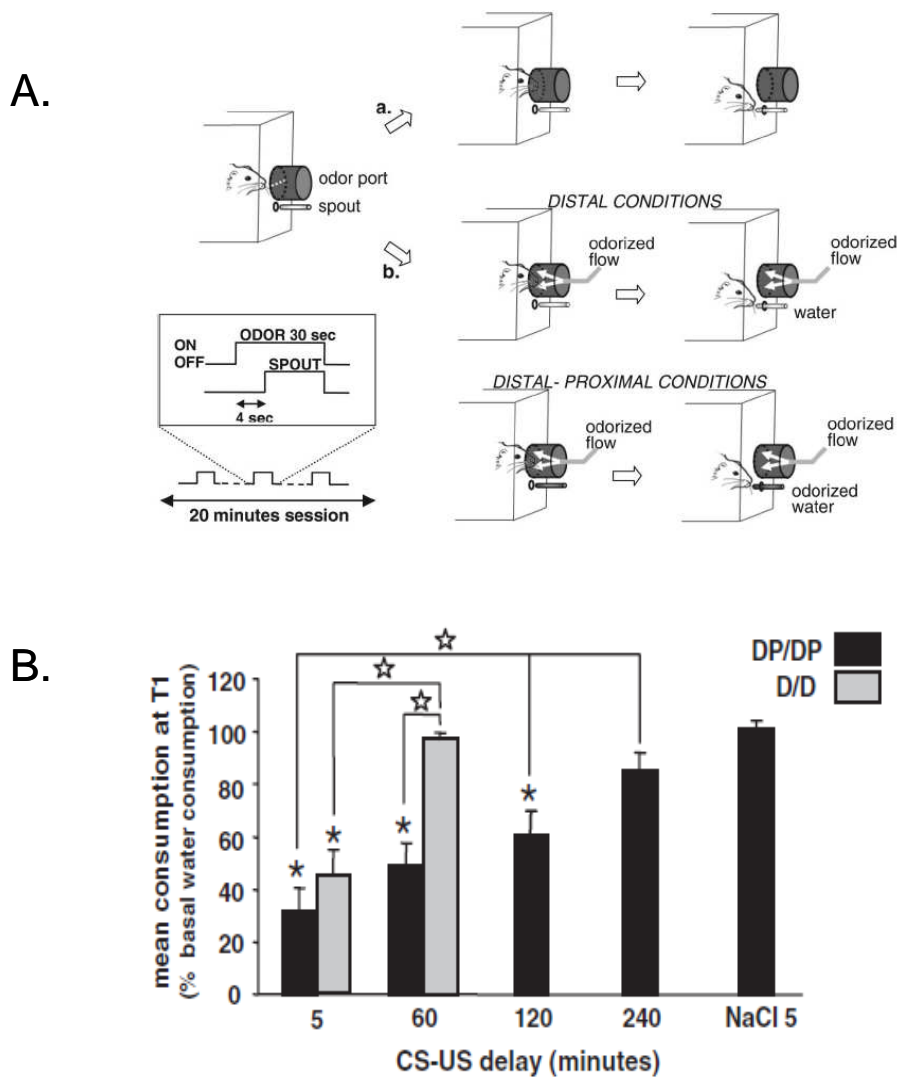


Figure 6. (A) Schéma présentant le protocole expérimental utilisé par Chapuis et al. pour induire l'AOC suivant le mode de présentation de l'odeur (distal ou distal/proximal). La cage est équipée d'un port olfactif associé à une cellule photovoltaïque et d'un tube mobile délivrant la boisson. (a.) Les rats sont d'abord habitués à fractionner leur consommation d'eau et déclencher l'introduction du tube en introduisant la tête dans le port olfactif ce qui interrompt le faisceau optique. Après 4s, le tube apparaît et se retire au bout de 26s. Le rat doit alors recommencer s'il veut continuer à boire. Une fois la consommation d'eau stabilisée, l'AOC peut être induite. (b.) Durant les sessions avec les stimulations olfactives, l'interruption du faisceau provoque dans le port la libération d'un flux d'air odorisé (acétate d'isoamyl). 4s plus tard, le tube apparaît contenant soit de l'eau (condition distale, D), soit de l'eau odorisée avec l'acétate d'isoamyl (0.01%) (condition distale/proximale, DP). Plusieurs sessions sont réalisées. Dans le coin gauche de la figure sont représentés les différents événements qui se déroulent durant une session.

(B) L'intensité de l'AOC dépend du mode de présentation de l'odeur et du délai inter-stimuli. Consommation moyenne de solution odorisée (condition distale/proximale [DP]) ou d'eau (condition distale [D]) est exprimée en pourcentage de la consommation basale d'eau. Les mêmes conditions ont été utilisées pour les sessions d'acquisition et de rappel de l'AOC. Une astérisque symbolise une différence significative du groupe contrôle (NaCl ; 5min ; $p < 0.01$). Une étoile symbolise une différence significative entre deux groupes ($p < 0.01$; d'après Chapuis et al., 2007).

Pour finir nous pouvons mentionner qu'un autre type d'AOC existe, basée sur l'association d'une odeur avec un SI oral plutôt que viscéral. Une odeur initialement neutre, comme la vanille, la banane ou l'amande (mélangée à l'eau de boisson), peut devenir aversive si elle a été associée plusieurs fois avec le goût amer de la quinine (Fanselow et Birk, 1982 ; Sakai et Yamamoto, 2001). Il en résulte que les animaux diminuent leur consommation de la solution odorisée lorsqu'elle leur est présentée de nouveau sans le goût amer. Néanmoins très peu de travaux se sont intéressés à ce modèle.

B.II.3. Aversion olfactive potentialisée par le goût (AOPG)

Un certain nombre d'études se sont penchés sur des conditionnements alimentaires particuliers possédant une dimension olfactive. Comme nous venons de le voir, il n'était pas possible d'obtenir une AOC valable si l'odeur distale était présentée seule et que l'IIS dépassait quelques minutes. Néanmoins lorsque l'odeur distale est accompagnée de la consommation d'une solution gustative, alors un malaise gastrique même décalé dans le temps engendre non seulement une AGC mais aussi une AOC, les deux approximativement de même intensité (Rusiniak et al., 1979). Des animaux conditionnés avec les mêmes SC goût et odeur mais présentés séparément développaient respectivement une AGC normale mais une AOC très faible (Rusiniak et al., 1979 ; Palmerino et al., 1980). Ces expériences montraient que la présence du goût permettait à l'odeur d'être associée à un malaise gastrique malgré un IIS important. Ce type de conditionnement est encore aujourd'hui appelé aversion olfactive potentialisée par le goût (AOPG).

Ces données allaient à l'encontre de l'idée généralement admise depuis Pavlov que deux SC dans un même composé entraînent en compétition pour s'associer avec le SI. Dans cette compétition, le SC le plus saillant prenait le pas sur le moins saillant ; ce qui porte le nom de masquage (Rescorla & Wagner, 1972). Deux théories principales ont été proposées pour expliquer ce phénomène de potentialisation. La première théorie, formulée par Garcia et ses collègues, repose sur une notion majeure de l'ensemble du travail de celui-ci : le corps possède deux systèmes de défense contre les agressions, un système externe et un système interne. Dans son « *sensory and gate channeling* », « pont » ou « porte sensorielle » comme il plaira, le goût est un SC ingéré donc interne et en relation directe avec les stimuli viscéraux. Ce goût va permettre de lier l'odeur, SC externe, aux stimuli

viscéraux. La théorie repose donc sur l'idée que seul le goût peut faire le lien entre l'odeur et le milieu interne et qu'il ne peut donc y avoir d'aversion gustative potentialisée par l'odeur (pour revue, voir Batsell et Blankenship, 2002).

La seconde théorie a été proposée par Durlach et Rescorla (1980) et appelée en anglais « *within-compound associations* » que nous pourrions traduire par « les associations à l'intérieur du mélange ». Elle stipule que trois associations se font durant l'apprentissage de l'AOPG : une association goût/malaise, une autre odeur/malaise et une dernière goût/odeur. Lors du rappel, la présentation de l'odeur seule réactive les associations odeur/malaise et odeur/goût. La première constitue un accès direct au malaise tandis que la deuxième, via le goût en constitue un accès indirect. L'aversion pour l'odeur se trouve donc renforcée par ces deux voies. Contrairement à la théorie de Garcia, celle-ci suppose que n'importe lequel des deux SC devrait pouvoir potentialiser l'autre. Des données en faveur de chacune des théories ont été observées suggérant que cela pourrait dépendre du type de mélange odeur-goût (pour revue, voir Batsell et Blankenship, 2002).

B.II.4. Préférence olfactive conditionnée (POC)

La POC repose sur l'association d'une odeur (ou une saveur) avec un SI possédant une valeur hédonique positive. Plusieurs types de POC peuvent être modélisés suivant la nature du SI associé au SC (Tableau 1). Le SI peut être uniquement oral comme le goût agréable d'un sucre qui n'apporte aucune composante post-ingestive, posséder en plus du goût sucré une composante énergétique qui en fait un renforcement oral/viscéral, ou bien n'être que viscéral lorsqu'il induit un apport énergétique après avoir été introduit au niveau gastro-intestinal.

La première POC repose sur l'association d'une odeur (ou d'une saveur) associée à un SI oral comme un goût sucré, la saccharine ou le fructose. L'une des caractéristiques importantes pour la mise en place de cette POC est la présentation simultanée des deux stimuli SC et SI (Holman, 1975 ; Capaldi et al., 1987a ; Sclafani et Ackroff, 1994 ; Fanselow et Birk, 1982 ; Sakai et Yamamoto, 2001). Le choix de la saccharine comme goût sucré comparé à d'autres sucres comme le glucose par exemple, n'est pas fortuit. En effet la saccharine est un édulcorant et ne possède donc aucune qualité énergétique. Elle joue ainsi un rôle de renforcement exclusivement oral (Holman, 1975).

SI SC	<u>Oral</u> (Goût sucré)	<u>Oral/viscéral</u> (goût sucré et énergie)	<u>Viscéral</u> (énergie seule, Infusion intragastrique)
Odeur	Vanille, Amande / Saccharine (Sakai & Yamamoto, 2001)	Amande /sucrose (Harris et al., 2000)	Vanille, menthe / polycose (Lucas & Sclafani, 1995)
Flaveur	Kool-Aid / Fructose* (Sclafani & Ackroff, 1994)	Kool-Aid / sucrose (Gilbert et al., 2003)	Kool-Aid / maltodextrine (Touzani & Sclafani, 2005)

* Le fructose dans ces conditions n'apporte aucun renforcement post-ingestif (Sclafani et al., 1999).

Tableau 1. Récapitulatif des différents éléments composant l'association SC-SI utilisés dans la littérature permettant d'induire une POC.

Un autre sucre capable de jouer ce rôle de SI oral est le fructose. Malgré son appartenance à la famille des carbohydrates, il ne présente pas de caractéristiques post-ingestives s'il est présenté à faibles doses et durant de courtes expositions (Sclafani et al., 1999). Une analyse similaire a été proposée pour le sucrose dont les effets renforçateurs sont essentiellement oraux, lorsqu'il est présenté à faibles doses et durant de courtes expositions (Dwyer, 2005).

La POC peu également résulter de l'association entre une odeur (ou une flaveur) et un SI qui s'avère oral et viscéral lorsque le sucre utilisé à des effets post-ingestif comme le glucose ou le galactose (Sclafani et al., 1999). Enfin il est possible d'induire des POC avec un SI uniquement viscérale en injectant les carbohydrates directement au niveau gastrique (Sclafani et al., 1999)

Il est important de noter que de manière générale les tests de rappel des POC sont constitués par des tests de choix soit entre de l'eau odorisée (non renforcée) et de l'eau normale soit entre deux biberons odorisés (une odeur, CS+, ayant été préalablement associée au renforcement et l'autre, CS-, à de l'eau). Les animaux consomment alors plus de la solution dont la flaveur était associée au nutriment. Cette augmentation de la consommation témoigne donc bien d'une préférence conditionnée pour la solution associée au nutriment (pour revue voir Myers et Sclafani, 2006).

Comme les autres conditionnements classiques, la POC repose sur plusieurs caractéristiques importantes : nombre d'associations, IIS et durée de rétention. A la différence de l'aversion, la POC nécessite souvent plus d'associations SC-SI (Tableau 2). Ceci tient sûrement au fait que par nature, éviter les aliments toxiques est plus vital que consommer les plus nutritifs. Mais une étude récente montre qu'il est possible d'induire une préférence forte pour une saveur en un seul essai si celle-ci a été couplée à une infusion intra gastrique de glucose (Myers, 2007). En ce qui concerne l'IIS, certains auteurs rapportent qu'il est possible d'induire une préférence saveur/nutriment avec un IIS pouvant aller jusqu'à plusieurs heures mais en pratique la concomitance des deux stimuli est préférable (Tableau 2 ; Elizalde et Sclafani, 1988 ; Capaldi et Scheffer, 1992). Pour finir, la durée de rétention peut être longue et les POC présentent souvent la caractéristique de résister à l'extinction, même après plusieurs tests sans renforcement (Myers, 2007).

	Nombre d'associations SC-SI	IIS	Durée de rétention
AGC	1	< 2 heures	Plusieurs semaines
AOC Odeur distale Odeur proximale	1 1	< 5 min < 2 heures	Plusieurs semaines Plusieurs semaines
AOPG	1	< 2 heures	Plusieurs semaines
POC	> 3	Présentation simultanée	Plusieurs semaines

Tableau 2. Récapitulatif des différentes caractéristiques comportementales de l'AGC, de l'AOC, de l'AOPG et de la POC.

B.II.5. Conclusion

Nous avons vu qu'il existait plusieurs types de mémoires alimentaires toutes regroupées dans les conditionnements classiques associatifs tels que les a décrits Pavlov au début du XXe. Basés sur l'association de SC gustatifs et/ou olfactifs et de SI oraux ou post-ingestifs de valence hédonique négative (aversion) ou positive

(préférence), ces conditionnements peuvent être modélisés en laboratoire. Si certains comme l'AGC ont été très étudiés tant sur le plan comportemental que neurobiologique, d'autres comme l'AOC, ou la POC sont encore méconnus. Nous allons donc voir dans ce qui suit les connaissances dont nous disposons au sujet des bases neurobiologiques qui sous-tendent les différents conditionnements alimentaires.

C. Bases neurobiologiques des conditionnements alimentaires

Nous avons évoqué brièvement au début de la thèse que les informations gustatives et olfactives étaient « captées » dans la bouche ou le nez. Nous développerons ici plus en détail les voies qui permettent l'acheminement des informations sensorielles olfacto-gustatives jusqu'aux premières zones d'intégration au sein du cerveau mais aussi des informations en provenance du système digestif puisque c'est une composante majeure des apprentissages alimentaires. Par cette revue, nous mettrons en avant les structures cérébrales communes ou distinctes qui sous-tendent ces conditionnements. Des approches corrélationnelles, en particulier de marquage cellulaire, et des approches interventionnelles, lésionnelles et pharmacologiques, ont permis de mesurer l'implication de ces structures dans les différents processus des aversions et préférences conditionnées.

C.I. Aversions gustatives conditionnées

Comme tous les conditionnements classiques, les aversions peuvent être séparées en trois phases distinctes : l'acquisition, la consolidation et la rétention (Bures et Buresova, 1990). Lors de l'acquisition les animaux perçoivent le SC et le SI et intègrent l'association entre les deux stimuli. Cette association est ensuite stockée durablement ce qui constitue la phase de consolidation. Enfin la représentation du SC réactive l'association SC-SI et provoque la RC, c'est le rappel (Figure 2). Ce découpage en plusieurs phases des aversions pose la question de savoir précisément quelles structures sont impliquées dans quelle phase. Du fait d'une acquisition en un essai, d'un IIS long et d'une durée de rétention importante, il est relativement facile d'intervenir sur les structures cibles durant chaque phase. Notre propos n'étant pas de faire une liste exhaustive des structures et mécanismes de l'AGC, nous nous pencherons surtout sur ses principaux acteurs.

C.I.1. Voies neuroanatomiques des informations gustatives

Les travaux d'anatomie montrent que l'information gustative est collectée au niveau des papilles gustatives de la langue qui forment des bourgeons de cellules sensorielles gustatives, reliées à des cellules nerveuses. Ces dernières lorsqu'elles sont stimulées envoient un signal jusqu'au faisceau du noyau du tractus solitaire (NTS) situé dans le tronc cérébral, via trois nerfs crâniens : nerf facial (VII), le nerf glossopharyngien (IX) et le nerf vague (X). Chez le rat, l'information est relayée du NTS vers le noyau parabrachial (NPB), particulièrement le NPB médian qui répond à des stimulations gustatives (Figure 7 ; Smith et St John, 1999 ; Yuan et Barber, 1991). Le NTS et le NPB projettent ensuite directement ou indirectement via le thalamus et la partie parvicellulaire de son noyau ventropostéromédian (VPMpc) sur l'amygdale, en particulier ses noyaux basolatéral (NBL) et central (NC ; pour revue Lamprecht et Dudaï, 2000). Enfin le dernier relais de l'information gustative se révèle être le cortex insulaire (CI) ou néocortex gustatif qui occupe la région dorsale du sulcus rhinal et est bordé par les cortex somesthésiques primaire et secondaire. Sur un axe dorso-ventral trois régions peuvent être distinguées dans le CI : les régions granulaire, dysgranulaire et agranulaire. Grâce à des études de traçages on situe normalement la région gustative à cheval entre les deux premières (Bermudez-Rattoni, 2004 ; Cechetto et Saper, 1987). Ces régions diffèrent aussi par leurs afférences : le granulaire reçoit des informations du VPMpc et de l'amygdale, le dysgranulaire est aussi connecté au VPMpc et à l'amygdale en particulier le NBL, et l'agranulaire reçoit surtout des informations du NTS et du NPB (Sewards et Sewards, 2001).

C.I.2. Voies neuroanatomiques des informations viscérales

Dans le cas des aversions basées sur un SI viscéral, les informations provenant des viscères sont majoritairement nociceptives. Des études d'électrophysiologie et de marquage d'activité ont montré que l'injection intrapéritonéale de chlorure de lithium (LiCl) augmentait la décharge des nerfs splanchnique (système sympathique) et du nerf vagal (système parasympathique) en particulier des fibres C reconnues pour être l'une des voies de transmission du message de la douleur (Nijima et Yamamoto, 1995). Ces nerfs projettent sur la région caudale du NTS, puis vers le

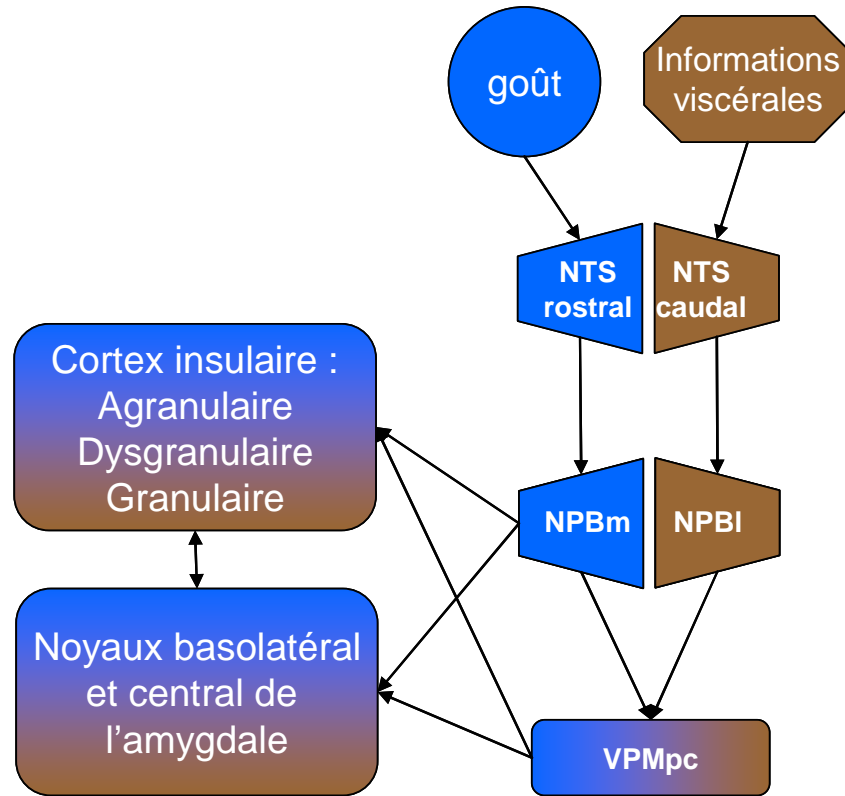


Figure 7. Représentation schématique des voies de traitements des informations gustatives (bleu) et viscérales (marron). NTS : noyau du tractus solitaire, NPBm : noyau parabrachial médian, NPBI : noyau parabrachial latéral, VPMpc : zone parvicellulaire du noyau ventroposteromédian du thalamus.

NPB dont la partie latérale répond à des stimulations viscérales et le thalamus (Figure 7 ; Spray et Bernstein, 2004 ; Smith et St John, 1999 ; Saper et Loewy, 1980 ; Yuan et Barber, 1991). Le NBL, le NC et la partie dorsale du CI, donc le granulaire, reçoivent eux aussi une partie de ces informations viscérales via leurs connections avec le NTS, le NPB et le thalamus (Cechetto et Saper, 1987 ; Lamprecht et Dudaï, 2000). Il apparaît donc que les informations gustatives et viscérales cheminent parallèlement via des structures communes comme le NTS, le NPB ou le thalamus, mais aboutissent surtout au niveau de certains noyaux amygdaliens (NBL et NC) et des différentes parties du CI (granulaire/dysgranulaire Figure 7).

C.I.3. Substrat neurobiologique de l'AGC

Depuis une trentaine d'années, l'approche lésionnelle par lésions électrolytiques, électrochimiques ou ablations d'endroits précis du cerveau animal a permis de considérablement faire avancer les connaissances sur l'AGC. Une approche plus fine, la pharmacologie est ensuite venue compléter ces données : alors que la lésion permanente d'une structure ou d'un système de structure peut être compensée par l'enrôlement d'un autre système, une inactivation temporaire permet de cibler l'action d'une structure donnée à un moment précis.

Noyau de tractus solitaire et noyau parabrachial

Les premières cibles des études lésionnelles ont logiquement été les premiers relais des informations gustatives et viscérales, à savoir le NTS et le NPB (Tableau 3). Par exemple des lésions électrolytiques du NTS chez le rat avant ou après une AGC perturbe la perception des différents goûts sans pour autant empêcher les animaux d'apprendre et de retenir l'AGC (Grigson et al., 1997a,b). Par contre la lésion iboténique du NPB avant une AGC perturbe complètement l'acquisition de celle-ci (Scalera et al., 1995 ; Yamamoto et al., 1995). La communication entre le NTS et le NPB est donc indispensable à la mise en place d'une AGC mais un rôle plus important est donné au NPB en affirmant que les lésions de celui-ci provoquent des dommages plus importants sur l'AGC que la lésion de n'importe quelle autre structure (Yamamoto et al., 1995). En spécifiant un peu la zone de lésion il apparaît que les différentes parties du NPB ne semblent pas avoir le même rôle dans cet apprentissage en particulier le NPB médian qui traite surtout l'information gustative.

Aversion Gustative Conditionnée

Structure	Auteurs	Interventions	Effets des lésions	Acquisition	Consolidation	Rappel récent
NTS	Grigson et al. (1997)	Lésions électrolytiques	Pas d'effet			
NPB	Ivanova & Bures (1990a,b)	Tétrotoxine		Perturbe	Perturbe	Pas d'effet
Amygdale centrale (lésions)	Bermudez et al. (1986) Yamamoto Fujimoto (1991) Hatfield et al. (1992) Ferry et al. (1995) Morris et al. (1999) St Andre et Reilly (2007)	électrolytiques excitotoxiques excitotoxiques excitotoxiques excitotoxiques excitotoxiques	Pas d'effet Pas d'effet Pas d'effet Pas d'effet Pas d'effet Pas d'effet			
NBL (lésions)	Bermudez et al. (1986) Dunn et Everitt (1988) Yamamoto Fujimoto (1991) Hatfield et al. (1992) Ferry et al. (1995) Schafe et al. (1998) Morris et al. (1999) St Andre et Reilly (2007)*	électrolytiques électrolytiques excitotoxiques excitotoxiques excitotoxiques excitotoxiques électrolytiques excitotoxiques excitotoxiques excitotoxiques	Pas d'effet Perturbe Pas d'effet Perturbe Pas d'effet Pas d'effet Perturbe Pas d'effet Perturbe Perturbe* Pas d'effet*			
NBL (pharmaco)	Bermudez et al. (1983) Gallo et al. (1992) Ferry et al. (1995) Hatfield Gallagher (1995) Yasoshima et al. (2000) Ferry et Di Scala (2000) Bahar et al. (2003)	Novocaïne (NBL+Ce) Tétrotoxine (NBL+Ce) Agoniste GABA Antagoniste NMDA Antagoniste AMPA Antagoniste NMDA Antagoniste NMDA Inhibiteur synthèse protéique		Pas d'effet Perturbe Pas d'effet Pas d'effet Perturbe Perturbe Pas d'effet		Perturbe Pas d'effet Perturbe
Cortex insulaire (pharmaco)	Gallo et al., (1992) Rosenblum et al. (1993) Naor et Dudaï (1996) Berman et al. (2000) Ferreira et al. (2002)	Tétrotoxine (NBL+Ce) Inhibiteur synthèse protéique Antagoniste muscarinique Antagoniste AMPA Antagoniste NMDA		Perturbe Perturbe Perturbe	Perturbe Perturbe	Perturbe Perturbe
Cortex cingulaire antérieur	Ding et al., (2008)**	Lidocaïne				Pas d'effet** Perturbe**

*: la lésion du NBL atténue l'AGC pour un goût nouveau mais pas pour un goût familier.

** : l'inactivation du CCA n'a pas d'effet sur le rappel récent (1 jour) mais bloque le rappel ancien (1mois) de l'AGC.

Tableau 3. Résumé des travaux montrant l'importance de certaines structures cérébrales dans les différents étapes de l'AGC.

La lésion électrolytique de ce noyau empêche l'acquisition du CTA en bloquant le SC (Reilly et al., 1993), tandis que la lésion du noyau latéral serait plus impliqué dans le traitement de l'information viscérale (Yamamoto et al., 1994). Tout concorde à dire que le NPB est primordial dans le processus d'association entre le SC et le SI. Cette hypothèse semble d'ailleurs confirmée par l'infusion intracérébrale de tetrodotoxine (TTX) à divers moments de l'apprentissage de l'AGC afin de bloquer temporairement le NPB. Ainsi l'infusion de TTX avant ou juste après l'acquisition, donc la mise en relation des deux stimuli, perturbe fortement l'AGC. Au contraire réalisée juste avant le rappel de l'aversion, la même infusion n'a pas d'effet sur l'AGC (Ivanova et al., 1991, pour revue voir Reilly, 1999).

Enfin pour des animaux décérébrés (lésion entre le tronc cérébral et le télencéphale) il devient impossible d'acquérir l'AGC, signe que le NTS et le NPB sont nécessaires mais pas suffisants à la mise en place de cette AGC (Grill et Norgren, 1978).

Thalamus

La lésion du VPM induit un déficit de l'AGC qui semble ne pas être lié au traitement de l'information gustative mais plutôt au traitement de l'association SC-SI (Yamamoto, 1993). En effet cette lésion n'empêche pas les animaux de réagir à des stimuli gustatifs. Néanmoins, une lésion restreinte au VPMpc n'avait aucun effet sur l'acquisition d'une AGC (Reilly et Pritchard, 1996). Les perturbations observées dans la première étude seraient essentiellement dues à des lésions plus larges qui auraient touché d'autres zones adjacentes, en particulier d'autres noyaux du thalamus. Au vu des données anatomiques et lésionnelles le thalamus apparaît plutôt comme un relais de l'information du NPB vers les zones d'intégration comme l'amygdale et le cortex insulaire (Yamamoto et Sakai, 1995).

Amygdale

L'amygdale est une structure cérébrale située dans le lobe temporal ventral et composée de plusieurs noyaux qui peuvent être distingués par rapport à leur ancienneté phylogénétique ou leur localisation : noyaux profonds, centro-médians et superficiels (Mc Donald, 1998). Connue pour jouer un rôle déterminant dans les apprentissages émotionnels comme les conditionnements de peur par exemple,

l'amygdale a aussi fait l'objet d'un important nombre d'études, parfois contradictoires, concernant les AGC (Tableau 3).

Différents travaux d'imagerie cellulaire utilisant l'expression du gène d'activité précoce Fos et de sa protéine ont mis en évidence une augmentation d'activité dans le NBL et le NC de l'amygdale suite au malaise gastrique (LiCl) montrant bien que l'information viscérale transite par ces structures (Ferreira et al., 2006 ; Lamprecht et Dudaï, 1995 ; Yamamoto et al., 1997). Une étude très récente indique une augmentation du nombre de neurones du NBL activés par le malaise chez des animaux ayant préalablement ingéré un goût nouveau suggérant une convergence des informations SC-SI au sein du NBL qui pourrait participer à l'association SC-SI (Barot et al., 2009).

Néanmoins, les études lésionnelles relativisent l'importance du NC et du NBL. Elles montrent que la lésion du NC n'entraîne aucun effet tandis que celle du NBL peut avoir ou non des effets sur l'AGC (Tableau 3). Ces effets semblent dépendre du mode conditionnement et du type de lésion (Dunn et Everitt, 1988 ; Schafe et al., 1998). La lésion électrolytique détruit corps cellulaires et fibres de passage alors que la lésion excitotoxique ne touche que les corps cellulaires. Le déficit d'AGC induit par lésion électrolytique du NBL pourrait donc être dû à la destruction des fibres de passages, par lesquelles transite l'information gustative vers le CI (Dunn et Everitt, 1988). Des effets perturbateurs de la lésion excitotoxiques du NBL sur l'AGC sont rapportées (Morris et al., 1999 ; St Andre et Reilly, 2007 ; Yamamoto et Fujimoto, 1991) mais cela dépendrait de la nouveauté du goût (St Andre et Reilly, 2007 ; pour revue : Reilly et Bornovalova, 2005 ; Lamprecht et Dudaï, 2000).

De façon similaire, les études pharmacologiques donnent des résultats contradictoires concernant l'implication du NBL dans l'acquisition (Tableau 3). Toutefois, il semble que le NBL puisse participer au traitement du SI comme l'atteste les effets perturbateurs de différents traitements appliqué juste avant le SI (Gallo et al., 1992 ; Miranda et al., 2003 ; Yasoshima et al., 2000). Le rôle du NBL dans le traitement de l'information viscérale a également été souligné par des données de microdialyse. Le malaise gastrique induit une importante libération de glutamate, neurotransmetteur excitateur, dans le NBL dépendante de l'intensité du malaise (Miranda et al., 2002). L'infusion de glutamate dans le NBL juste avant un faible SI facilitent l'AGC (Miranda et al., 2002).

Enfin nous pouvons citer des travaux portant sur d'autres processus mnésiques comme la consolidation et le rappel de l'AGC. Le rôle du NBL dans la consolidation de l'AGC reste à démontrer : l'infusion d'un inhibiteur de protéines dans le NBL n'induit aucun déficit de l'AGC (Bahar et al., 2003). Par ailleurs l'inactivation du NBL ou de certains de ces récepteurs (AMPA) juste avant le test de rappel donne des résultats contrastés (Tableau 3).

Tous ces résultats laissent donc penser que le NBL participe à l'AGC, en particulier au traitement du SI, mais ne joue pas un rôle indispensable à l'acquisition, la consolidation et le rappel de l'AGC.

Cortex insulaire

Les zones granulaire et dysgranulaire du CI sont connues du point de vue neuroanatomique pour être des zones associatives des informations gustatives et viscérales (Sewards et Sewards, 2001). Il a été d'ailleurs été montré une augmentation de l'activité cellulaire du CI après une association goût-malaise, alors qu'aucune des stimulations n'active le CI individuellement (Desmedt et al., 2003 ; Ferreira et al., 2006).

Les études lésionnelles montrent un rôle indéniable du CI dans les AGC : l'aspiration du CI, les lésions électrolytiques et les lésions excitotoxiques induisent un déficit important de l'AGC (Kiefer et Braun, 1977 ; Lasister et al., 1982 ; Bermudez-Rattoni et al., 1991, Roman et al., 2006). Le déficit ne semble pas provenir de la perception du goût mais plutôt de l'attribution d'une valeur hédonique. En effet il est vérifié que des animaux lésés peuvent faire la différence entre différents goûts et réagissent normalement à une stimulation viscérale (Lasiter et al., 1983).

L'inactivation par la TTX du CI juste avant l'acquisition perturbe l'AGC (Tableau 3 ; Gallo et al., 1992). Le système cholinergique et le système glutamatergique du CI ont des fonctions différentes dans la mise en place de l'AGC. L'infusion de scopolamine, un antagoniste des récepteurs muscariniques, dans le CI juste avant l'acquisition d'une AGC perturbe la MCT et la MLT de l'AGC tandis que l'infusion d'AP5, antagoniste NMDA perturbe seulement la MLT (Ferreira et al., 2002). Ces résultats laissent penser que respectivement il participe à l'acquisition (encodage du nouveau goût) et la consolidation de l'AGC. Concernant la consolidation de l'AGC, celle-ci est bloqué par l'infusion dans le CI d'un inhibiteur de synthèse protéique, l'anisomycine, avant l'acquisition (Roseblum et al., 1993). Le CI semble aussi être

impliqué dans le rappel puisque l'inactivation du CI ou de certains de ces récepteurs (AMPA) juste avant un rappel récent (3 jours après l'acquisition) perturbe l'AGC (Berman et al., 2000 ; Gallo et al., 1992).

Outre son importance dans la formation et le rappel de l'AGC, le CI participerait également à la persistance, autrement dit au stockage, de l'AGC. En effet, des études récentes ont mis en évidence que la phosphorylation continue d'une protéine, la protéine kinase Mzeta (PKM ζ) est un mécanisme fondamental participant au maintien de la mémoire (Pastalkova et al., 2006 ; Serrano et al., 2008 ; Shema et al., 2007, 2008). L'inhibition de la PKM ζ au sein du CI perturbe de façon permanente un AGC déjà consolidées, même plusieurs semaines après l'apprentissage et, contrairement au phénomène de reconsolidation, sans réactivation préalable de la trace mnésique (Shema et al., 2007).

Enfin, il faut noter les études portant sur les interactions entre le CI et le NBL. A titre d'exemple, si comme nous l'avons vu plus haut l'infusion de glutamate dans le NBL renforce la mise en place d'une AGC lorsque le SI est faible, cette facilitation peut être contrecarrée par le blocage des récepteurs NMDA dans le CI (Ferreira et al., 2005). Il est proposé que le CI intégrerait le message gustatif, le NBL le traitement viscéral, et l'interaction des deux structures permettrait l'association SC-SI. Au niveau électrophysiologique, l'AGC augmente la connectivité fonctionnelle entre les neurones du CI et du NBL (Grossman et al., 2008), suggérant que la communication entre ces structures est nécessaire à la mise en place de l'AGC.

Cortex cingulaire antérieur

Pour conclure l'examen des structures revêtant une importance particulière pour l'AGC nous pouvons citer une zone du cortex préfrontal, le cortex cingulaire antérieur (CCA). La principale information à retenir à propos de cette structure est que son inactivation perturbe le rappel de l'AGC réalisée un mois après l'apprentissage (rappel ancien) mais n'a aucun effet sur un rappel réalisé le lendemain de l'acquisition (rappel récent ; Tableau 3 ; Ding et al., 2008). Il semble donc qu'avec le temps il s'opère une réorganisation des bases neurobiologiques qui sous-tendent le rappel de l'AGC. Ceci pourrait s'apparenter à la « consolidation systémique » mise en évidence dans certains types de mémoires spatiales et contextuelles dépendantes de l'hippocampe (pour revue voir Frankland et Bontempi, 2005 ; Wiltgen et al., 2006).

C.II. Aversions olfactives conditionnées

C.II.1. Voies de traitement de l'information olfactive

L'information olfactive est d'abord collectée au niveau de l'épithélium olfactif situé dans le nez, puis relayée au bulbe olfactif qui contient des neurones regroupés en unités fonctionnelles appelées glomérules. De là le message olfactif est envoyé vers le cortex olfactif primaire par le tractus olfactif latéral sans passer par un relais thalamique ce qui permet un traitement plus rapide que pour d'autres stimuli (Figure 8). Ce cortex olfactif primaire regroupe plusieurs structures telles que le noyau olfactif antérieur, le tubercule olfactif, le cortex piriforme et le cortex entorhinal (Shipley et Adameck, 1984). Après ce premier relais, l'information est dirigée vers un second niveau d'intégration qui regroupe plusieurs structures : le thalamus, le CI, le cortex orbitofrontal, l'hippocampe et enfin le NBL (Saper et al., 1982 ; Witter et al., 1988 ; Price et al., 1985). Ces structures possèdent pour la plupart d'importantes connexions entre elles. Ces données mettent en évidence le NBL et le CI comme zones de convergences des informations olfactives, gustatives et viscérales.

C.II.2. Substrat neurobiologique de l'AOC

Parce que l'AOC est longtemps restée un modèle difficile à mettre en place et ne donnant pas des résultats comportementaux optimaux, moins de choses que sur l'AGC sont connues au niveau neurobiologique.

Noyau de tractus solitaire et noyau parabrachial

Alors que des lésions du NTS chez le rat n'ont aucun effet sur l'AOC (Tableau 4A ; Grigson et al., 1997a), celles du NPB avant l'acquisition perturbe l'AOC que le SC olfactif soit présenté en distal ou en proximal, et ce sans altérer la perception des odeurs (Reilly et al., 1993 ; Grigson et al., 1998 ; Tableau 4B). Le rôle de premier relais des informations sensorielles et donc de site de l'association SC-SI semble bien confirmé pour le NPB que le SC soit un goût ou une odeur.

Amygdale

De nombreuses études se sont focalisées sur l'amygdale compte-tenu de ses importantes connexions avec le cortex piriforme (Price, 1973) et de ses afférences viscérales (Norgren, 1974). L'inactivation de l'amygdale (NBL+NC) avant la présentation d'une odeur distale perturbe l'AOC (Tableau 4A ; Bermudez-Rattoni et

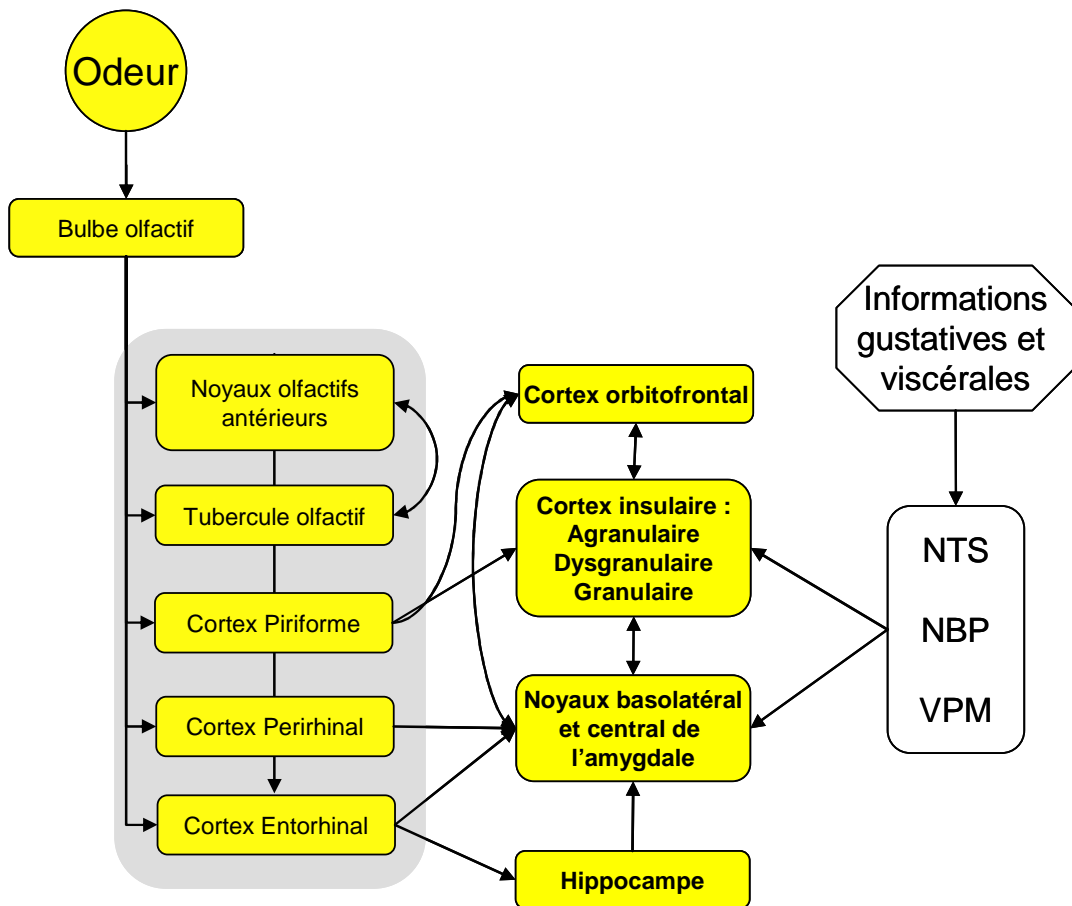


Figure 8. Représentation schématique des voies de traitements des informations olfactives (jaune). NTS : noyau du tractus solitaire, NBP : noyau parabrachial, VPM : noyau ventroposteromédian du thalamus. La zone grisée représente le cortex olfactif primaire.

al., 1983). Ce déficit ne semble pas lié au traitement du SC olfactif puisque les animaux sont toujours capables de reconnaître une odeur nouvelle ou d'associer l'odeur avec un autre SI cette fois externe tel un choc électrique (Bermudez-Rattoni et al., 1983). L'approche lésionnelle a permis d'identifier le NBL, et pas le NC, comme site nécessaire à l'AOC (Bermudez-Rattoni et al., 1986). Utilisant également un modèle d'AOC basé sur une odeur distale, donc nécessitant un IIS très court, Ferry et Di Scala (1997) montre que le blocage des récepteurs GABA_A dans le NBL, juste après la présentation du SC, permet d'induire une AOC avec un IIS de 30 minutes (Ferry et al., 1997). Le blocage de l'action inhibitrice des interneurons au sein du NBL semble permettre de garder une trace de l'odeur distale suffisamment longtemps en mémoire pour qu'elle soit associée au SI.

Ces résultats sont également à rapprocher des données obtenues sur l'AOPG où l'aversion olfactive est fortement perturbée par la lésion ou l'inactivation du NBL mais pas par celle du NC (Tableau 4B ; Bermudez et al., 1983, 1986 ; Fernandez-Ruiz et al., 1993 ; Ferry et al., 1995 ; Ferry et Di Scala, 2000 ; Hatfield et al., 1992 ; Hatfield et Gallagher, 1995 ; Inui et al., 2006).

Tous ces résultats vont dans le sens d'un rôle déterminant du NBL dans l'acquisition de l'AOC basé sur une odeur distale. Il reste toutefois à montrer le rôle du NBL dans l'acquisition d'une AOC avec une odeur proximale ainsi que dans les autres étapes de mémorisation (consolidation, rappel).

Cortex insulaire

Les afférences olfactives (via le cortex piriforme) et viscérale en plus de fortes connections avec le NBL font du CI un candidat sérieux pour les structures impliquées dans l'AOC (Sewards et Sewards, 2001). Néanmoins, la lésion permanente du CI n'a aucun effet sur l'acquisition ou la rétention de l'AOC (Tableau 4A ; Roman et al., 2006; Kiefer et al., 1982, 1984).

Dans l'AOPG, alors que la lésion du CI induit un sévère déficit de l'aversion au goût, elle n'engendre qu'une faible atténuation de l'aversion à l'odeur (Tableau 4B ; Fernandez-Ruiz et al., 1993; Inui et al., 2006; Kiefer et al., 1982, 1984 ; Lasiter et al., 1984). Seule une étude avec des lésions ventrales du CI (zone agrulaire) rapporte de réels déficits de l'aversion à l'odeur (Lasiter et al., 1984). Ces résultats sont à rapprocher de l'activation du CI lors du rappel de l'aversion à l'odeur après

l'apprentissage de l'AOPG (Dardou et al., 2007) et suggère que l'implication du CI dans l'AOPG dépendrait en grande part de la présence du stimulus gustatif.

Toutes les études ciblant le CI dans l'AOC (et l'AOPG) sont des études lésionnelles. Aussi compte tenu des mécanismes de compensation et de réorganisation post-lésionnelle, une approche pharmacologique serait plus adéquate, comme cela a été récemment utilisé dans un autre apprentissage olfactif alimentaire, la transmission sociale d'une préférence alimentaire (TSPA ; Fortis-Santiago et al., 2008). Dans la TSPA, un rat (observateur) préfère consommer une nourriture s'il a senti l'odeur de cette nourriture dans l'haleine d'un congénère (démonstrateur ; Galef et Wigmore, 1983). La TSPA repose sur une mémoire de l'odeur de l'haleine du rat démonstrateur et l'odeur de la nourriture que ce démonstrateur vient de consommer. L'inactivation du CI avant l'acquisition (interaction observateur-démonstrateur) ou le rappel (test de choix entre deux aliments) perturbe cette préférence soulignant l'importance du CI dans différentes étapes d'un apprentissage olfactif (Fortis-Santiago et al., 2008). Il serait donc intéressant de réévaluer le rôle du CI dans les différentes étapes de l'AOC par une approche pharmacologique.

Hippocampe

Plusieurs données existent à propos d'un possible rôle de l'hippocampe ou plutôt de la formation hippocampique dans l'AOC. Des lésions électrolytiques ou l'activation du système cholinergique de l'hippocampe bloque l'acquisition d'une AOC induite avec une odeur distale sans perturber pour autant la perception des odeurs (Tableau 4A ; Miller et al., 1986 ; Bermudez-Rattoni et al., 1987). Curieusement, la lésion du cortex entorhinal (appartenant à la formation hippocampique) facilite l'acquisition d'une AOC avec une odeur distale et un long IIS (Ferry et al., 1996 ; 2006). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle complexe de la formation hippocampique dans l'AOC.

Autres structures potentiellement impliquées

Une étude électrophysiologique récente indique que l'AOC engendre des activations spécifiques au sein du NBL et du CI mais également du bulbe olfactif et des corti piriforme, orbitofrontal et préfrontal médian (Chapuis et al., soumis).

L'importance fonctionnelle du bulbe olfactif et du cortex piriforme n'a pas été évaluée directement dans l'AOC. Néanmoins, chez le rongeur et l'homme, les

A. Aversion Olfactive Conditionnée

Structure	Auteurs	Interventions	Effets	Processus affecté
NTS	Grigson et al. (1997)	Lésions électrolytiques	Pas d'effet	
NPB	Reilly et al. (1993) Grigson et al. (1998)	Lésions électrolytiques Lésions excitotoxiques	Perturbe Perturbe	?
Amygdale	Bermudez-Rattoni et al. (1983) Bermudez-Rattoni et al. (1986) Ferry et al. (1997)	Novocaïne NBL+Ce Lésions électrolytiques NBL Lésions électrolytiques Ce Antagoniste GABA NBL	Perturbe Perturbe Pas d'effet Facilite	Acquisition ? Acquisition
Cortex insulaire	Kiefer et al. (1982, 1984) Roman et al. (2006)	Lésions par aspiration Lésions excitotoxiques	Pas d'effet Pas d'effet	
Formation hippocampique	Miller et al. (1986) Bermudez-Rattoni et al. (1987) Ferry et al. (1996; 2006)	Lésions électrolytiques hippocampe Infusions physostigmine hippocampe Lésions par aspiration cortex entorhinal	Perturbe Perturbe Facilite	? Acquisition Acquisition

B. Aversion Olfactive Potentialisée par un Goût

Structure	Auteurs	Interventions	Effets	Processus affecté
Amygdale centrale	Bermudez et al. (1986) Hatfield et al. (1992) Ferry et al. (1995)	Lésions électrolytiques Lésions excitotoxiques Lésions excitotoxiques	Pas d'effet Pas d'effet Pas d'effet	
NBL*	Bermudez-Rattoni et al. (1983) Bermudez-Rattoni et al. (1986) Hatfield et al. (1992) Fernandez-Ruiz et al. (1993) Hatfield et Gallagher (1995) Ferry et al. (1995) Ferry et Di Scala (2000) Inui et al. (2006)	Novocaïne (NBL+Ce) Lésions électrolytiques Lésions excitotoxiques Lésions 6-OHDA (NBL+Ce) Antagoniste NMDA Lésions excitotoxiques Agoniste GABA Antagoniste NMDA Lésions excitotoxiques (NBL+Ce)	Perturbe Perturbe Perturbe Perturbe Perturbe Perturbe Perturbe Perturbe	Acquisition ? ? ? Acquisition ? Acquisition Acquisition ?
Cortex insulaire**	Kiefer et al. (1982, 1984) Lasiter et al. (1985) Fernandez-Ruiz et al. (1993) Inui et al. (2006)	Lésions par aspiration Lésions électrolytiques dorsal Lésions électrolytiques ventral Lésions 6-OHDA Lésions excitotoxiques	Pas d'effet Pas d'effet Perturbe Pas d'effet Pas d'effet	?
Hippocampe	Miller et al. (1986) Bermudez-Rattoni et al. (1987)	Lésions électrolytiques Infusions physostigmine	Perturbe Perturbe	? Acquisition

*: aucune des interventions sur le NBL n'a perturbé l'AGC (exceptée Inui et al., 2006).

** : les différentes lésions du CI entraînent toutes une forte perturbation de l'AGC.

Tableau 4. Résumé des travaux montrant l'importance de certaines structures cérébrales dans l'AOC (A) et l'AOPG (B).

Préférence Olfactive Conditionnée

Structure	Auteurs	Interventions	SI oral	SI oral/viscéral	SI viscéral	Processus affecté
NPB médian	Reilly et al. (1993) Grigson et al (1998) Scafani et al. (2001)	Lésions excitotoxiques Lésions excitotoxiques Lésions excitotoxiques	Pas d'effet	Pas d'effet	Pas d'effet	
NPB latéral	Reilly et al. (2000) Navarro et Cubero (2003)	Lésions excitotoxiques Lésions électrolytiques	Pas d'effet	Perturbe		?
Amygdale	Sakai et Yamamoto (2001) Gilbert et al. (2003) Touzani et Scafani (2005)	Lésions excitotoxiques Lésions électrolytiques Lésions excitotoxiques	Perturbe Perturbe	Perturbe	Perturbe	? ? ?
Cortex insulaire	Cubero et Puerto (2000) Sakai et Yamamoto (2001) Touzani et Scafani (2007)	Stimulations électriques Lésions excitotoxiques Lésions excitotoxiques	Pas d'effet Pas d'effet		Induction Pas d'effet	?

Tableau 5. Résumé des travaux montrant l'importance de certaines structures cérébrales dans les différents types de POC.

apprentissages olfactifs aversifs induisent une plasticité spécifique du processus associatif dans le bulbe olfactif (Pager et Royet, 1976 ; pour revue : Mandairon et Linster, 2009) et le cortex piriforme (Gottfried et al., 2002 ; Jones et al., 2007 ; Li et al., 2008 ; Sevelinges et al., 2004). Dans un cadre d'odeur alimentaire, après l'apprentissage de l'AOPG, le cortex piriforme fait partie des structures activées lors de la présentation de l'odeur (Dardou et al., 2007).

Les structures frontales, cortex orbitofrontal et cortex préfrontal médian, pourraient potentiellement jouer un rôle dans l'AOC. Ces corti reçoivent directement des afférences du cortex piriforme (Johnson et al., 2000 ; Datiche et Catarelli, 1996). Ils sont activés par différents apprentissages olfactifs comme le AOPG ou la TSPA (Dardou et al., 2006, 2007 ; Smith et al., 2007). Au niveau fonctionnel, la lésion des afférences cholinergiques du cortex orbitofrontal perturbe la TSPA (Ross et al., 2005) et le cortex préfrontal médian est nécessaire à l'acquisition et la consolidation de la TSPA (Boix-Trelis et al., 2007 ; Carballo-Marquez et al., 2009) mais également d'un apprentissage associatif odeur-récompense (Carballo-Marquez et al., 2007 ; Tronel et Sara, 2003 ; Tronel et al., 2004). Ces corti pourraient donc revêtir une importance particulière dans l'AOC.

C.III. Préférences olfactives conditionnées

C.III.1 Bases neurobiologiques des POC

Peu d'études neurobiologiques se sont intéressées aux POC. De plus, la POC étant un modèle comportemental qui requiert plus d'associations que les aversions, la grande majorité des données existantes proviennent d'études lésionnelles (Tableau 5).

Noyau parabrachial

Les premières études portant sur le NPB établissent qu'il n'y a pas d'effet des lésions électrolytiques ou iboténiques du NPB médian sur les différents type de POC (Tableau 5 ; Reilly et al., 1993 ; Grigson et al., 1998 ; Sclafani et al., 2001). Lorsque la lésion est ciblé sur le NPB latéral, on observe aucun effet sur une POC avec un SI oral (saccharine ; Navarro et Cubero, 2003), mais une forte perturbation de celle avec un SI oral/viscéral (sucrose ; Reilly et al, 2000). Au final, ces résultats indiquent que le PBN n'est pas indispensable aux POC avec un SI/oral et que les zones

médiane et latérale du PBN participent différemment au POC ayant une composante viscérale.

Amygdale

Les lésions de l'amygdale perturbent les différents type de POC (Tableau 5 ; Gilbert et al., 2003 ; Sakai et Yamamoto, 2001 ; Touzani et Sclafani, 2005). Ces perturbations sont le résultat de lésions amygdaliennes étendue et comprenant le NBL et le NC. Une lésion restreinte au NBL atténue sans complètement perturber la POC avec un SI viscéral (Touzani et Sclafani, 2005). Les auteurs suggèrent ainsi que le noyau NBL contribuerait au POC sans être indispensable, au contraire de l'amygdale entière. Enfin le fait que les animaux ayant une lésion de l'amygdale soit capable de développer une préférence conditionnée pour un goût souligne le rôle important de l'amygdale dans le traitement et la mémorisation des informations olfactives.

Ces travaux démontrent l'implication de l'amygdale dans les POC. Néanmoins, ils ne permettent pas d'identifier les étapes de mémorisation dans lesquels l'amygdale intervient (acquisition, consolidation, rappel) ni les mécanismes associatifs impliqués.

Cortex insulaire

Recevant des informations gustatives, olfactives et viscérales (Saper, 1982 ; Hanamori et al., 1998 ; De Araujo, 2003), le CI est également un bon candidat pour la POC. Il semble possible d'induire une POC par des stimulations électriques du CI (Tableau 5). Ainsi une odeur proximale dont l'ingestion est couplée à une stimulation du CI sera préférée à une odeur non couplée à cette stimulation (Cubero et Puerto, 2000). Les auteurs suggèrent que la stimulation électrique du CI simule les effets positifs d'un nutriment. Par contre, la lésion du CI ne perturbe pas les POC avec un SI oral ou viscéral (Sakai et Yamamoto, 2001 ; Touzani et Sclafani, 2007). Il semble même que les animaux lésés présentent des POC plus nettes que les animaux contrôles (Touzani et Sclafani, 2007). Ces différences entre la stimulation et la lésion du CI suggère que l'intégrité du CI n'est pas nécessaire à la POC en condition normale (non-stimulée) mais que la stimulation électrique du CI pourrait activer d'autres structures normalement impliquées dans le traitement du SI viscéral comme le NBL et le NPB (voir Touzani et Sclafani, 2007).

Si le CI n'est pas impliqué dans les POC basées sur l'association odeur-goût sucré (Sakai et Yamamoto, 2001 ; Touzani et Sclafani, 2007), la lésion du CI perturbe l'association odeur-goût salé (Sakai et Imada, 2003). Contrairement aux POC classiques, ce modèle d'association odeur-goût ne reposerait pas sur la valeur hédonique du goût (préférable ou aversif) mais sur sa valeur qualitative (salé). Le CI serait donc important pour les associations entre l'odeur et la « qualité » du goût mais pas pour les associations entre l'odeur et la valeur hédonique du goût, c'est-à-dire les POC.

Si ces travaux suggèrent l'absence d'implication du CI dans les POC, il serait toutefois intéressant d'évaluer au travers d'une autre approche (l'imagerie par exemple) quelles modifications la POC induit au sein du CI et de le comparer à ce qui se passe au sein du NBL, étant donné la forte implication de l'amygdale dans les POC.

C.III.2. La POC : un modèle de convergence olfacto-gustative

Comme nous l'avons vu, très peu de choses sont connues au niveau des bases neurobiologiques des POC. Les études lésionnelles n'offrent malheureusement qu'un vague aperçu des différentes structures impliquées, sans pouvoir spécifier à quel moment chacune des structures intervient, ni quels sont les mécanismes cellulaires mis en jeu au sein des différents acteurs de ce conditionnement. Si nous savons que l'amygdale est recrutée dans la POC alors que le CI n'est pas indispensable, nous ne connaissons pas les mécanismes spécifiques dont l'amygdale, et plus particulièrement le NBL, pourrait être le siège.

Des études d'électrophysiologie et d'imagerie réalisées sur des apprentissages associatifs ont mis en évidence que le NBL était un site de plasticité induite par la convergence du SC et du SI (Blair et al., 2001 ; Barot et al., 2008). En particulier, après ces apprentissages, le nombre et/ou l'activité des neurones répondant au SC est augmentée (Blair et al., 2003 ; Dardou et al., 2006 ; Ferreira et al., 2005 ; Han et al., 2007 ; Romanski et al., 1993 ; Reijmers et al., 2007). D'après un des postulats de Hebb énoncé au début de cette introduction sur les connections synaptiques préférentielles entre neurones activés de façon concomitante (« *neurons that fire together wire together* » ; Hebb, 1949), cette augmentation serait due au recrutement de la population répondant au SI (Blair et al., 2003) sans que ce soit clairement démontré.

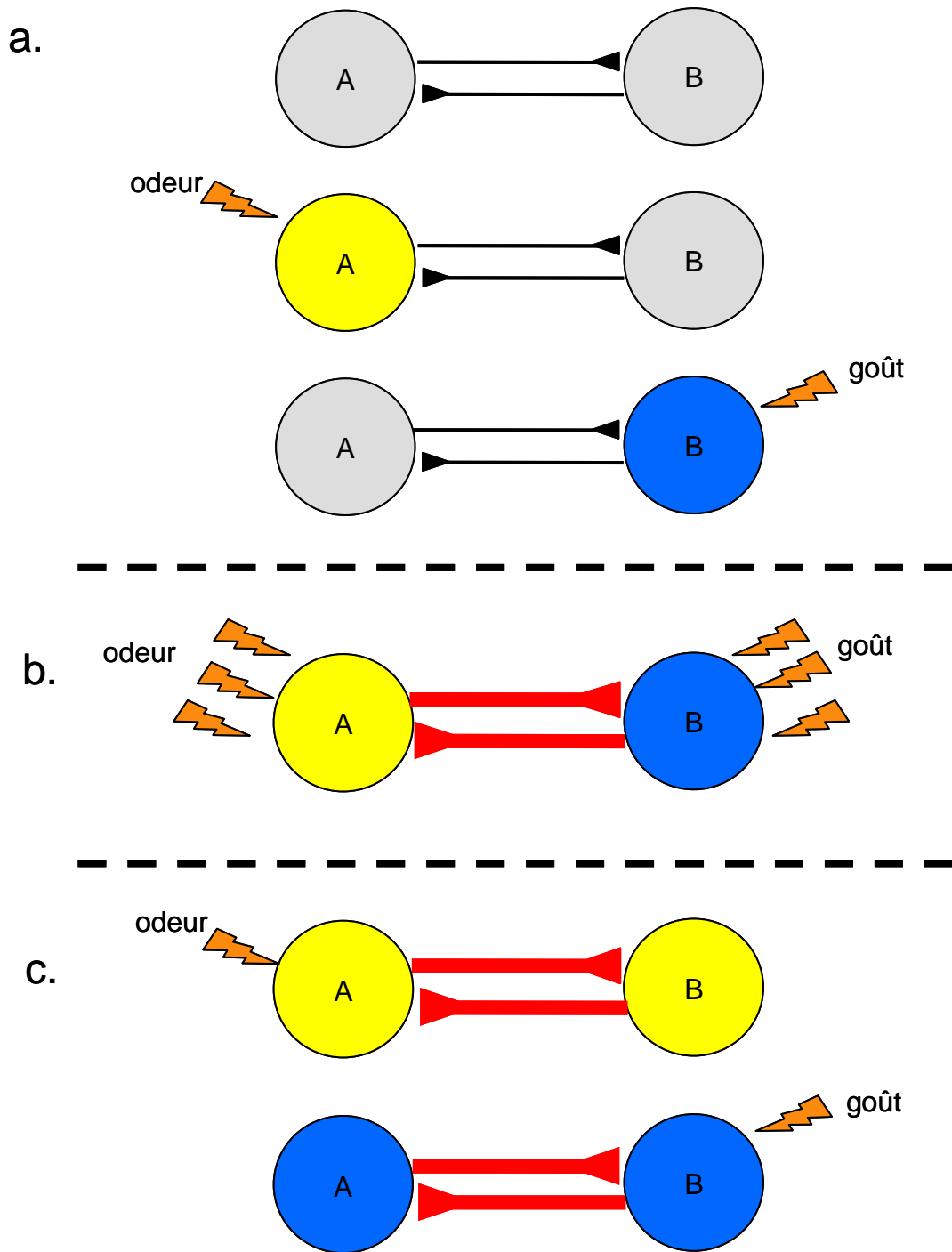


Figure 9. Représentation schématique de la règle de Hebb adaptée à la POC. (a) Le neurone A, activé par l'odeur (jaune) et le neurone B, activé par le goût (bleu) sont connectés (traits noirs). (b) La connexion entre A et B est augmentée (traits rouges) si A et B sont stimulés conjointement et de manière répétitive (comme durant la POC). (c.) Du fait de cette augmentation, l'odeur ou le goût activent les deux neurones.

Appliqué à un modèle de POC odeur-sucrose par exemple, il est donc envisageable que l'apprentissage de cette POC induise une augmentation de la population répondant à l'odeur dans le NBL et que cette augmentation soit la conséquence du recrutement d'une partie de la population répondant au goût sucré. L'inverse devrait aussi se révéler vrai : la POC induirait une augmentation de la population répondant au goût par le recrutement d'une partie de celle répondant à l'odeur. Imaginons deux neurones A et B connectés (Figure 9), l'un répondant à une odeur (neurone A) et l'autre à un goût sucré (neurone B). La présentation du mélange odeur-goût sucré active simultanément les neurones A et B qui, en se basant sur le modèle de Hebb, voient leurs connexions respectives renforcées. Ainsi, après plusieurs présentations du mélange, la simple présentation de l'odeur ou du goût active les deux neurones. Une fois le concept de la convergence énoncé, le problème de la technique permettant de visualiser cette convergence se pose.

L'électrophysiologie peut permettre de répondre à cette question. Néanmoins, l'enregistrement intracellulaire pose plusieurs problèmes. Tout d'abord celui de travailler sur des animaux anesthésiés et donc qui ne répondent pas de façon naturelle aux stimulations. Ensuite celui d'enregistrer un faible nombre de neurones, sachant que la population codant la convergence est mathématiquement plus faible (voire beaucoup plus faible) que la population répondant à chaque stimulation.

L'imagerie cellulaire permet de visualiser sur un grand nombre de neurones et chez un animal en train de se comporter les effets d'une stimulation. Malheureusement, l'imagerie cellulaire classique ne permet de visualiser le résultat que d'une seule stimulation. Par exemple, l'expression de Fos ou d'un autre gène d'activité précoce pourrait révéler l'augmentation de la population neuronale répondant à une odeur dans certaines structures cérébrales suite à son association avec un goût sucré, comme cela a été suite à l'AOPG (Dardou et al., 2006 ; 2007). Par contre cette technique ne montrerait pas si cette augmentation résulte du recrutement de la population normalement activée par le goût sucré. Il faudrait pour cela une technique d'imagerie cellulaire permettant de visualiser deux événements séparés dans le temps chez le même animal.

Une technique mise au point récemment et appelée catFISH (pour *cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescence in situ hybridization* ; Guzowski et al., 2001 ; 2005) pourrait permettre cela. Cette technique de marquage cellulaire permet de visualiser dans les différents compartiments d'une même cellule

(noyau et cytoplasme) l'expression du gène *Arc*¹ induite par deux stimulations distinctes séparées dans le temps. L'expression de *Arc* est visible dans le noyau d'une cellule activée 5 minutes après la stimulation (Figure 10). Il devient visible dans le cytoplasme (et plus dans le noyau) 25 minutes après la stimulation. Imaginons un animal soumis à deux stimulations espacées de 25 minutes et euthanasiés immédiatement après la seconde stimulation. Les cellules répondant à la première stimulation présenteront une activation cytoplasmique et celles répondant à la deuxième stimulation une activation nucléaire. Maintenant les cellules répondant aux deux stimulations présenteront une double activation, cytoplasmique (résultat de la première stimulation) et nucléaire (résultat de la seconde stimulation, Figure 9 ; Guzowski et al., 2001 ; Ramirez-Amaya et al., 2005). Appliqué à la POC, cela revient à utiliser l'odeur et le goût comme stimuli et à identifier dans le NBL et le CI les populations neuronales répondant d'une part à l'odeur et d'autre part au goût suite à l'apprentissage de la POC. Une étude très récente a utilisé cette technique du catFISH dans le modèle de l'AGC. Le conditionnement induit une augmentation du nombre de cellule répondant aux deux stimulations SC et au SI au sein du NBL indiquant une convergence cellulaire des informations gustatives et viscérales lors de l'AGC (Barot et al., 2008).

Cette approche devrait donc permettre d'évaluer au sein des structures d'intérêt si l'apprentissage de la POC engendre d'une part une augmentation de la population répondant à l'odeur et si d'autre part cette augmentation est la conséquence d'une augmentation de la convergence des informations olfactives et gustatives. Cette convergence témoignerait d'une certaine plasticité du cerveau, permettant de modifier la réponse des neurones aux différents stimuli.

¹ Le gène *Arc* a fait l'objet d'un certain nombre d'études destinées à mesurer son rôle dans la plasticité synaptique et les processus mnésiques comme la consolidation ou la potentialisation à long terme (pour revue voir Guzowski, 2002). L'utilisation d'antisens *Arc* ou de souris mutantes n'exprimant pas le gène *Arc* montre que l'expression de ce gène participe à la consolidation de mémoires aussi diverses que des mémoires spatiales, la reconnaissance d'objet, la peur conditionnée ou l'AGC (Guzowski et al., 2000 ; Plath et al., 2006). *Arc* pourrait donc être l'un des acteurs de la plasticité neuronale.

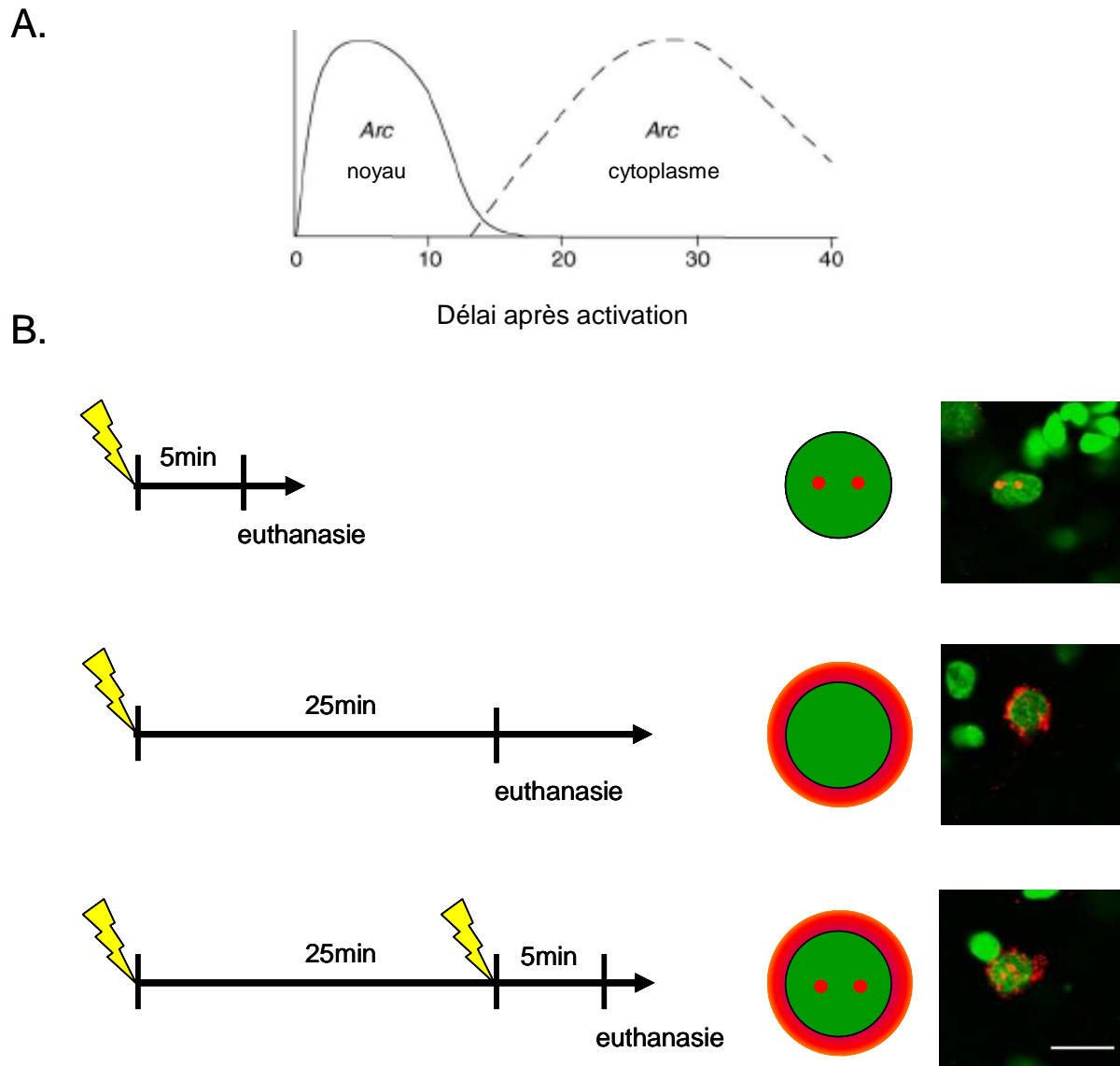


Figure 10. Principe de la technique du catFISH. (A) Cinétique d'expression du gène d'activité précoce *Arc* et compartiment cellulaire où est visible cette expression. (B) 5 min après une stimulation (éclair jaune), l'expression de *Arc* (deux foci rouges) est visible dans le noyau du neurone (vert). 25 min après cette stimulation l'expression de *Arc* a migré dans le cytoplasme (auréole rouge). Si la première stimulation est suivie d'une seconde 25 min plus tard, le neurone, répondant aux deux stimulations, présente au final un double marquage (cytoplasmique pour la première stimulation et nucléaire pour la seconde). Les photos à droite représentent des exemples de neurones pour chaque type de marquage (adapté de Barot et al., 2008). La barre blanche horizontale équivaut à 10 μm .

OBJECTIFS DE LA THESE

Objectifs de la thèse

Nous venons de voir au cours de l'introduction que les apprentissages alimentaires olfacto-gustatifs pouvaient constituer un excellent moyen d'investiguer les bases neurobiologiques de la mémoire. Cependant ces recherches se sont essentiellement focalisées sur les AGC. En effet celles-ci ont depuis longtemps fait l'objet de nombreuses études du fait de leurs caractéristiques comportementales : un apprentissage en un essai, un IIS pouvant être long et une durée de rétention très importante. Si les modèles d'apprentissages alimentaires reposant sur l'autre modalité chimiosensorielle, l'odeur, ont jusqu'ici été peu investigués, l'odeur étant considérée plus difficile à utiliser comme SC, il existe désormais des modèles d'AOC et de POC valides pour rechercher les bases neurobiologiques des apprentissages olfactifs (Tableau 6).

Deux structures télencéphaliques ont particulièrement retenu notre attention, le NBL et le CI, compte-tenu de leurs importantes afférences olfactives, gustatives et viscérales. En particulier, des études lésionnelles ont mis en évidence un rôle prépondérant du NBL comparé au CI dans l'AOC et la POC. Néanmoins plusieurs questions subsistent :

- L'absence d'effet de la lésion du CI traduit-elle une absence de nécessité réelle dans la formation (acquisition, consolidation) et/ou le rappel (récent/ancien) de la mémoire olfactive alimentaire ou reflète-t-elle des phénomènes de compensation dus à l'approche utilisée ?

- Dans quelles étapes de la formation (acquisition, consolidation) et/ou du rappel (récent/ancien) de la mémoire olfactive alimentaire intervient le NBL ?

- Si ces apprentissages olfactifs alimentaires reposent sur une participation du NBL mais pas du CI, quelles modifications neuronales engendrent-ils ? En particulier, l'apprentissage olfactif s'accompagne-t-il d'une modification de la population neuronale répondant à l'odeur et plus précisément codant l'association SC-SI ? Cette plasticité est-elle spécifique du NBL et donc absente dans le CI ?

AOC	Amygdale basolatérale	Cortex insulaire	
Acquisition	+	?	++
Consolidation	?	?	++
Rappel récent	?	?	++
Rappel ancien	?	?	?
POC	Amygdale basolatérale	Cortex insulaire	
↗ Convergence SC-SI	?	?	

 : résultats obtenus sur l'AGC

Tableau 6. Résumé des principales questions auxquelles nous avons souhaité répondre au cours de la thèse. En rouge : les points à éclaircir ; en noir : les résultats de la littérature.

Afin de répondre à la première question concernant l'implication réelle du CI dans les apprentissages olfactifs alimentaires, nous avons privilégié l'approche pharmacologique. Celle-ci permet d'une part de pallier au phénomène de compensation très fréquemment induit par une approche lésionnelle et d'autre part d'intervenir de façon transitoire et spécifique sur différentes étapes des processus mnésiques que sont l'acquisition, la consolidation et le rappel. Pour réaliser cette approche dans les meilleures conditions, l'idéal est de travailler sur un modèle d'apprentissage olfactif possédant les mêmes caractéristiques que les modèles classiques d'AGC (apprentissage en un essai, long IIS, rétention importante). La POC nécessitant plusieurs associations (sans IIS) pour induire un conditionnement optimal, l'approche pharmacologique est difficilement envisageable. Nous avons donc préféré comme modèle l'AOC avec une odeur mélangée à la boisson dans des conditions proches de celles établies précédemment par Slotnick et collaborateurs (1997).

Pour caractériser le rôle du CI dans la formation de la mémoire, nous procéderons à des infusions de lidocaïne, un anesthésique local, pour bloquer l'action possible du CI lors de l'acquisition d'une AOC. Puis nous infuserons de l'anisomycine, un inhibiteur de synthèse protéique, dans le CI afin de bloquer la synthèse protéique et observer les effets sur la consolidation d'une AOC. Ensuite nous testerons les effets de l'inactivation du CI, par infusion de lidocaïne une nouvelle fois, sur le rappel d'une AOC récente (3 jours) mais aussi ancienne (un mois) tant il est vrai que certaines structures corticales, comme le cortex préfrontal médian, sont importantes pour le rappel d'AGC ancienne plutôt que récente (Ding et al., 2008). Dans une perspective comparative, nous réaliserons les mêmes interventions pharmacologiques dans un modèle d'apprentissage alimentaire où le CI est nécessaire à ces différentes étapes mnésiques, l'AGC.

Le deuxième objectif de la thèse sera de préciser dans quelles étapes de la formation et du rappel de la mémoire olfactive alimentaire intervient le NBL. Là encore nous utiliserons une approche pharmacologique sur le modèle d'AOC pour les raisons mentionnées ci-dessus.

La première étape consistera en une caractérisation du rôle du NBL dans l'acquisition de l'AOC en l'inactivant avec du muscimol, un agonistes des récepteurs

GABA_A, avant ou juste après la présentation de l'odeur. Les effets de l'inactivation du NBL seront également mesurés sur l'acquisition d'une mémoire olfactive non aversive. La littérature montre que l'implication du NBL dans le rappel des apprentissages aversifs est soit temporaire, comme dans la tâche d'évitement passif (<10 jours ; Liang et al., 1996), soit permanente, comme dans la peur conditionnée (Maren et al., 1996). Afin de savoir si le NBL est impliqué de façon transitoire ou permanente dans le rappel de l'AOC, des infusions de muscimol dans le NBL seront réalisées avant le rappel d'une AOC récente (3 jours) ou ancienne (un mois).

Dans la seconde étape, pour caractériser le rôle du NBL dans la consolidation de l'AOC, nous procéderons à des infusions d'un inhibiteur de synthèse protéique, l'anisomycine. Ces infusions au sein du NBL seront réalisées à différents moments de l'apprentissage, afin de caractériser la fenêtre temporelle d'action de l'anisomycine. Nous évaluerons également l'effet de ces traitements sur la MCT et la MLT avec comme hypothèse sous-jacente que la seule MLT devrait être affectée par le blocage de la synthèse protéique (Dudaï, 2004).

Partant de l'idée que le NBL et le CI participent différemment aux apprentissages olfactifs alimentaires, la dernière partie de la thèse cherchera à caractériser au niveau cellulaire un codage différentiel de l'association SC-SI au niveau du NBL et du CI suite à l'apprentissage. L'importance du NBL dans le codage de l'association SC-SI ayant été mis en évidence essentiellement sur des apprentissages aversifs comme la peur conditionnée (Blair et al., 2001, 2003) ou l'AGC (Barot et al., 2008), il nous a semblé plus opportun et original de poser cette question sur un apprentissage appétitif tel que la POC, reposant sur l'association d'une odeur et d'un goût sucré.

Faisant l'hypothèse que la POC augmentera la population neuronale codant l'association, c'est-à-dire la convergence des informations olfactives et gustatives, nous avons utilisé une nouvelle approche d'imagerie, le catFISH (pour *cellular compartment analysis of temporal activity by fluorescence in situ hybridization*). Cette technique de marquage cellulaire permet de visualiser dans les différents compartiments d'une même cellule (noyau et cytoplasme) l'expression du gène *Arc* induite par deux stimulations distinctes séparées dans le temps. Appliqué à notre modèle d'associations olfacto-gustatives, cela revient à identifier dans le NBL et le CI les populations neuronales répondant d'une part à l'odeur et d'autre part au goût suite à l'apprentissage de la POC. Il s'agira alors de quantifier les cellules présentant

une convergence des stimulations olfacto-gustatives, c'est à dire répondant aux deux stimulations, et à les comparer à celles d'animaux pseudo conditionnés (familiarisés à l'odeur et au goût séparément).

MATERIELS ET METHODES

Matériels et méthodes

Animaux

Nous utilisons au cours de la thèse des rats mâles adultes Wistar (Janvier, France) d'un poids allant de 280 à 320 gr, âgés en moyenne de 8 semaines au moment des procédures comportementales. Elevés en fratrie de 4 ou 5 individus, ils sont ensuite isolés en cage individuelle en plastique (42X21X18cm). La pièce réservée aux animaux est maintenue durant toute la durée des expériences à une température constante de 25°C, dans un cycle alterné lumière/nuit de 12hrs. Toutes les manipulations comportementales sont réalisées durant la phase lumineuse du cycle, approximativement entre 10:00 et 12:00 le matin et point important dans la cage d'élevage. Les animaux ont accès libre à l'eau et la nourriture durant toute la période précédant les expérimentations. Lorsque les manipulations comportementales débutent, la nourriture reste *ad libitum* mais l'eau est restreinte suivant des conditions précises que nous détaillerons plus loin. Tous les animaux sont traités en accord avec les législations française et européenne concernant l'expérimentation animale, incluant les autorisations 006352 et A37801 du Ministère Français de l'Agriculture et la directive européenne 86/609/EEC.

Procédures comportementales

Aversions

Les deux modèles d'aversion conditionnées que nous utilisons dans la thèse sont construits sur des principes communs. L'AOC et l'AGC reposent sur l'association d'un stimulus initialement neutre et nouveau (respectivement l'odeur et le goût) et d'un stimulus inconditionnel (SI ; agent émétique). Le stimulus neutre devient ainsi conditionnel (SC) et entraîne une réponse conditionnelle (RC). Cette RC se traduit par une diminution significative de la consommation du SC quand celui-ci est représenté, synonyme d'aversion conditionnée. Ce conditionnement peut se faire en une seule association, supporter un intervalle inter stimuli (IIS) important

comparé aux conditionnements associatifs classiques (plusieurs heures) et perdurer dans le temps (plusieurs semaines).

Aversion olfactive conditionnée

Le jour précédent le début des expérimentations, les rats sont privés d'eau durant vingt-quatre heures afin de créer un stress hydrique. Cette privation va permettre de motiver les animaux à boire les solutions présentées durant l'acquisition et les tests. Le premier jour des expérimentations ils sont habitués à boire de l'eau normale dans une bouteille graduée (0.5 ml de précision) quinze minutes par jour durant cinq jours (entre 10:00 et 12:00) dans leur propre cage. Cette mesure de la consommation permet d'établir une consommation basale quotidienne d'eau qui servira de référence aux consommations d'eau et de solutions cibles durant les différentes phases de l'apprentissage. Le jour de l'acquisition, les rats reçoivent une solution odorisée à la banane (acétate d'isoamyl, 0.01% ; Iso, Sigma, France) durant quinze minutes. De précédentes recherches utilisant des rats anosmiques ont confirmé qu'une solution d'acétate d'isoamyl à une concentration de 0.1% est caractérisée seulement par ses propriétés olfactives et non gustatives (Slotnick et al., 1997). Ici nous l'utilisons à une concentration dix fois moins moindre (0.01%). Un certain délai suivant la présentation du SC (allant de 15 à 240 minutes suivant les expériences), les rats reçoivent une injection intrapéritonéale de chlorure de lithium (LiCl ; 125 mg/kg, 0.4M, 7.5ml/kg; Sigma, France). Le LiCl est un agent émétique qui induit un malaise gastrique chez l'animal. Ce malaise est caractérisé par des symptômes bien précis : diminution d'activité, diarrhées et position allongée sur le ventre. Le jour suivant les rats ont de nouveau accès *ad libitum* à l'eau durant 15 minutes dans le but de rétablir un niveau de base de consommation d'eau. Le moment des tests diffère suivant l'expérience en cours : 4 heures après l'acquisition pour tester la mémoire à court terme, 48 heures après l'acquisition pour la mémoire à long terme et enfin un mois après l'acquisition pour la mémoire à très long terme. Durant ces tests, la solution odorisée est présentée durant 15 minutes et la consommation relevée. L'aversion est représentée par le pourcentage de solution odorisée consommée durant le test par rapport au niveau de consommation basale d'eau établi avant l'acquisition.

Aversion gustative conditionnée

La procédure comportementale de l'AGC est sensiblement la même que celle de l'AOC vue précédemment. En effet seul diffère le SC utilisé qui, dans le cas présent, est une solution sucrée de saccharine (0.1%). Après avoir été privés durant 24 heures les animaux sont habitués à boire de l'eau normale pour atteindre un niveau basal. Le jour de l'acquisition, les rats sont confrontés avec une solution sucrée de saccharine qui à cette concentration ne possède que des propriétés gustatives (Slotnick, 1997). La solution est présentée durant 15 minutes puis nous réalisons une injection de LiCl (125 mg/kg, 0.4M, 7.5ml/kg). Le lendemain les animaux ont à nouveau accès à l'eau *ad libitum* durant 15 minutes. Là aussi le jour du test diffère suivant le type de mémoire testée : 48 heures après l'acquisition pour la mémoire à long terme, un mois plus tard pour la mémoire à très long terme. Comme pour l'AOC, durant le test une nouvelle présentation de la solution sucrée est faite afin de mesurer l'aversion pour cette solution sucrée. L'index aversif est calculé par rapport à la consommation basale d'eau.

Préférence olfactive conditionnée

La préférence olfactive conditionnée (POC) est basée ici sur la présentation répétée d'une association odeur-goût sucré. Les animaux apprennent donc à associer une odeur nouvelle et neutre (donc aversive si l'on prend en compte la néophobie) avec un goût. Lorsqu'ils sont de nouveau confrontés à cette odeur, seule cette fois, ils témoignent une préférence significative pour cette odeur. Le principe de la POC diffère de l'AOC sur plusieurs points. Le premier bien évidemment est la valence hédonique du renforcement. De plus, notre étude est basée sur un type de POC odeur/goût, donc sans composante viscérale ce qui signifie ici sans apport énergétique. Deuxième point, contrairement à l'AOC, inductible en une seule association, la POC basée sur l'association odeur/goût nécessite un nombre plus important d'associations SC-SI.

Afin de déterminer quelle association odeur/goût va permettre d'induire la meilleure préférence (c'est-à-dire la plus rapidement mise en place et la plus robuste), les rats sont divisés en plusieurs groupes destinés à recevoir chacun un mélange odeur/goût précis durant 30 minutes par jour. Trois groupes différents ont été déterminés : un groupe reçoit une solution d'acétate d'isoamyl/saccharine, un autre reçoit une solution d'acétate d'isoamyl/fructose et le dernier reçoit une solution

d'acétate d'isoamyl/sucrose. Trois autres groupes reçoivent les mêmes composés odeur et goût mais présentés séparément afin de constituer des groupes contrôles d'animaux pseudo conditionnés. Les concentrations des différents éléments sont les suivantes : acétate d'isoamyl 0.01%, saccharine 0.1%, fructose 8% et sucrose 3.4%. Tous les animaux reçoivent le mélange ou les éléments séparés durant 9 jours et subissent des tests après 3, 6 et 9 jours de conditionnement. Ces tests permettent de déterminer à quel moment s'opère le changement de valence hédonique de l'odeur : autrement dit à quel moment l'odeur initialement aversive devient préférentielle ? Les tests se déroulent de la manière suivante : le jour du test deux biberons sont présentés aux rats durant 15 minutes, l'une remplie seulement d'eau et l'autre de solution d'acétate d'isoamyl. La consommation est relevée et comparée entre chaque groupe expérimental et son groupe contrôle pour vérifier qu'il y a bien eu un apprentissage de la POC dans un premier temps. Dans un second temps les consommations sont comparées entre les différents groupes expérimentaux pour savoir quelle condition (quel goût) permet d'induire la meilleure préférence.

En ce qui concerne les animaux destinés aux expériences immunohistochimiques de catFISH, le protocole diffère quelque peu car les rats ne sont pas testés. Dans cette expérience, un groupe d'animaux est ajouté, le groupe contrôle cage. Ce groupe ne reçoit aucune stimulation durant toute l'expérimentation et consomme eau et nourriture *ad libitum*. Après 9 présentations du mélange odeur-goût (groupe conditionné) ou des deux éléments séparés (groupe pseudo conditionné, cf. plus haut), deux solutions sont présentées durant 5 minutes chacune. La première est la solution d'acétate d'isoamyl classique à 0.01%. La seconde, 25 minutes plus tard, est la solution de sucrose à 3.4%. Ces présentations vont provoquer dans le cerveau des réponses spécifiques dans les zones olfacto-gustatives que la technique du catFISH devrait nous permettre de caractériser. Notons que la solution de sucrose est présentée en second afin de ne pas amener les animaux à un état de satiété qui pourrait les empêcher de boire si l'odeur était présentée après le goût. Des animaux sans stimulation ou ayant reçu de l'eau durant tout le conditionnement et les tests sont utilisés comme contrôles.

Procédures chirurgicales

Tous les animaux (hormis ceux destinés aux expériences exclusivement comportementales) sont anesthésiés avec un mélange de kétamine (70 mg/kg) et de xylazine (6 mg/kg) administré par injection intrapéritonéale. Ils se voient ensuite implanter cérébralement deux guides canules en acier inoxydable (23-gauge, Plastic One, Roanoke, VA) à l'aide d'un cadre stéréotaxique standard (Kopf Instruments, Bioseb, France). La taille des guides et leur position changent suivant l'expérience. Ainsi concernant l'implantation dans le noyau basolatéral de l'amygdale les guides canules mesurent 17 mm et sont placés à -2.8 mm en antéro-postérieur par rapport au Bregma, \pm 5.1 mm latéralement par rapport à la ligne médiane et -5.5 mm ventralement par rapport à la dure-mère (Paxinos et Watson, 1998). La pointe des guides canules est ainsi située 2 mm au dessus du NBL. Dans les expériences ciblant le cortex insulaire les guides mesurent 15 mm et sont placés à +1.2 mm en antéro-postérieur par rapport au Bregma, \pm 5.5 mm en latéral par rapport à la ligne médiane et -4.1 mm ventralement par rapport au Bregma (Paxinos et Watson, 1998). Les guides canules sont implantés 2 mm au dessus de la zone granulaire et dysgranulaire du CI ou 3 mm au dessus de la zone agranulaire du CI. Ces positions ont été choisies en fonction de travaux préalables qui déterminent ces zones comme de possibles lieux de convergences des informations olfactives, gustatives et viscérales (Sewards et Sewards, 2001). Enfin dans les expériences ciblant le cortex orbitofrontal les guides canules mesurent 17 mm et sont placés à +3.2 mm en antéro-postérieur par rapport au Bregma, \pm 3 latéralement par rapport à la ligne médiane et -3.5 mm ventralement par rapport au Bregma (Paxinos et Watson, 1998). Enfin ici aussi les guides sont placés 2 mm au dessus de la zone cible à savoir la jonction entre les zones ventrale et latérale du COF. Dans tous les cas, les guides canules sont fixés avec du ciment dentaire et ancrés au crâne à l'aide de deux vis chirurgicales. Des mandrins sont insérés dans les guides afin de prévenir le bouchage des guides. A la fin les rats disposent d'une semaine avant le début des expériences pour se remettre de la chirurgie.

Drogues et procédures d'infusion

Dans le but de mesurer l'implication de certaines structures cérébrales dans les différents processus mnésiques des AOC et AGC, nous procéderons à des infusions intracérébrales de drogues. Ces drogues vont permettre de bloquer de manière transitoire l'action du NBL, du CI ou encore du COF dans l'acquisition, la consolidation ou le rappel d'une AGC ou d'une AOC. Plusieurs drogues possédant des modes d'action différents seront utilisées.

Lidocaïne : la lidocaïne hydrochloride (Sigma, France) est un anesthésique local agissant sur la conduction sodique des neurones. En bloquant les canaux sodiques voltages-dépendants, elle empêche la dépolarisation de la membrane et par là la conduction des potentiels d'action. Elle est dissoute dans une solution saline stérile à 0.9% pour obtenir une concentration finale de 4%. La concentration de lidocaïne infusée a été choisie sur la base de précédents travaux rapportant une inhibition complète de l'activité neurale dans les 5 minutes qui suivent l'infusion et perdurant 20 à 30 minutes (Boehnke & Rasmusson, 2001; Tehovnik & Sommer, 1997; Lomber, 1999). Ainsi une infusion réalisée juste avant le conditionnement devrait inactiver le CI seulement durant la période d'acquisition.

Anisomycine : l'anisomycine (Ani, Sigma, France) est un inhibiteur de synthèse protéique. La formation de la mémoire à long terme nécessitant une synthèse protéique (Alberini, 2008; Davis & Squire, 1984; Dudai, 2004; Helmstetter et al., 2008), l'infusion d'Ani a pour but de bloquer la consolidation de certaines mémoires. L'Ani est dissoute dans l'acide chlorhydrique, ajustée au pH ~7.2 avec de la soude et amené avec de la solution saline à une concentration finale de 62,5µg/0.5µl pour les infusions dans le NBL, 100µg/µl pour les infusions dans le CI. Les doses et concentrations ont été choisies en fonction de précédents travaux montrant un effet de l'Ani infusée dans le NBL ou le CI sur la formation d'une mémoire aversive (Bahar et al., 2003 ; Huff & Rudy, 2004 ; Maren et al., 2003 ; Milekic et al., 2007 ; Schafe & LeDoux, 2000 ; Berman & Dudai, 2001 ; Berman et al., 2003 ; Rosenblum et al., 1993). Cette concentration induit une inhibition de protéine dans le NBL de 50 à 80% et dans le CI de près de 90% avec un plateau atteint 20 minutes après l'infusion et durant 3 heures environ (Duvarci et al., 2006).

Muscimol : le muscimol (Sigma, France) est un agoniste des récepteurs GABA α . En l'infusant dans une structure donnée nous allons pouvoir stimuler le système inhibiteur et donc rendre la structure inactive. Le muscimol est dissous dans la

solution saline pour obtenir une solution concentrée à 0.5µg/0.5µl. Plusieurs essais ont été réalisés afin de trouver une concentration qui n'altérerait pas le comportement des animaux. Ces doses et concentration sont confirmées par des études qui montrent un effet du muscimol lorsqu'il est infusé dans le NBL durant le conditionnement de peur apprise (Maren et al., 2001 ; Ponnusamy et al., 2007 ; Laurent et Westbrook, 2008). Ainsi il devrait être possible de bloquer l'action du NBL lors de l'acquisition d'un conditionnement aversif alimentaire.

Tous les animaux sont habitués à être manipulés individuellement, à peu près 3 minutes par jour durant les 3 jours qui précèdent l'acquisition. Cette manipulation a pour effet de réduire le stress et habituer les animaux à être maintenu en contention le temps de l'infusion intra cérébrale. Le jour de l'infusion, les rats sont donc maintenus en contention « douce », les mandrins bloquant les guides canules retirés et les aiguilles d'infusion (30 gauges) insérées dans les guides. Ces aiguilles dépassent du guide de 2 mm dans tous les cas sauf dans une des expériences contrôles concernant le CI où les aiguilles dépassent de 3 mm afin d'atteindre une zone plus profonde. Les aiguilles d'infusion sont reliées via des tubes en polyéthylène à des seringues Hamilton de 10µl qui sont actionnées par une pompe automatique de microinfusion (Harvard Apparatus, Bioseb, France). Dans le NBL, un volume total de 0.5µl d'Ani ou 0.25 µl de mus par hémisphère est délivré ; dans le CI, 0.5µl de lidocaïne ou 1µl d'Ani par hémisphère. Ces drogues sont infusées sur une période de 1 à 2 minutes et les aiguilles sont laissées en place une minute de plus afin de permettre une bonne diffusion de la drogue dans les tissus et éviter qu'elle ne reflue.

Procédures immunohistochimiques

Afin de vérifier dans quelle mesure se fait l'inhibition de la synthèse protéique au sein du NBL et des structures adjacentes après une infusion d'Ani, nous évaluerons cette inhibition en mesurant l'expression du gène Fos, marqueur important de l'activité cellulaire. Puis nous mesurons le nombre de neurones présents au site d'infusion en utilisant le NeuN, marqueur nucléaire qui permettra de déterminer si l'Ani entraîne une mort cellulaire spécifique. Enfin dans la troisième partie de la thèse, portant sur la POC et ses bases neurobiologiques, nous mesurerons l'expression d'un gène d'activation précoce, *Arc*, dont la cinétique d'expression

particulière nous apportera des réponses quant aux événements qui entraînent l'activation des cellules du NBL et du CI. Cette technique s'appelle le catFISH.

Fos et NeuN

Pour réaliser les contrôles immunohistochimiques, les animaux doivent être euthanasiés à la fin des expériences comportementales. Pour ce faire, tous les rats sont anesthésiés profondément en recevant une injection i.p. de 1 ml de pentobarbital sodique. Après ouverture de la cage thoracique, ils sont perfusés par voie intracardiaque avec 250 ml de sodium nitrite à 1% pour dilater les vaisseaux et éviter la formation de caillots de sang, puis avec 500 ml d'une solution fixatrice de paraformaldéhyde à 4% et tampon phosphate (pH 7.4, 0.1M). La perfusion terminée, les cerveaux sont prélevés et post-fixés à 4°C dans la même solution durant 24h. Passé ce délai les cerveaux sont plongés dans une solution de sucrose à 30% et tampon phosphate qui joue le rôle de cryoprotecteur, et stockés à 4°C. Les cerveaux sont ensuite coupés en sections coronales de 40 µm à l'aide d'un cryostat (Leica, Paris, France) et gardées à 4°C. Les coupes sont mises dans des puits contenant du PBS azide (antifongique).

Les coupes flottantes sont d'abord mises à incuber durant 30 minutes dans du PBS contenant de l'eau oxygénée à la concentration de 0.1%. Cette première étape permet d'éliminer la peroxydase endogène. Les coupes sont ensuite immergées durant une heure dans une solution de PBS contenant 0.3% de Triton X-100, 0.1% de sodium azide et 1% d'albumine de sérum bovin (BSA, Roche Diagnostics, Corporation, Indianapolis, IN, USA). Pour la protéine Fos, les coupes sont mises à incuber durant 96 heures à 4°C avec un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'extrémité 4-17 N-terminal de la protéine Fos humaine (1:50000 dans du PBS-Triton-azide-BSA, Oncogen Research Products). Les coupes sont alors incubées 3 heures durant à 4°C avec un sérum de mouton anti-lapin gamma globulines dilué 1/400 dans du PBS-BSA, suivi par une nuit complète d'incubation à 4°C avec une solution d'un complexe peroxydase-antiperoxydase de lapin (1 :1000 dans du PBS-BSA, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA). Concernant le NeuN, les coupes sont mises en incubation durant 96 heures à 4°C avec un anticorps monoclonal de souris dirigé contre la protéine spécifique des neurones NeuN (1 :8000 dans du PBS-Triton-azide-BSA, Chemicon). Elles sont ensuite mises à incuber une nuit entière à 4°C avec une solution de peroxydase de mouton anti-souris (1 :1000 dans du PBS-BSA,

Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA). Entre chaque traitement les coupes sont rincées soigneusement avec du PBS. Le complexe peroxydase est ensuite révélé après une incubation dans une solution de Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) contenant 0.04% d'hydrochloryde de diaminobenzidine (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA), 0.3% de sulfate de nickel d'ammonium et 0.003% d'eau oxygénée.

Enfin toutes les coupes (Fos et NeuN) sont rincées, montées sur des lames gélatinées, séchées, déshydratées par des bains d'alcool dont la concentration est croissante, accentuées dans le toluène et finalement couvertes avec du Depex (BDH Laboratory supplies, Poole, UK).

Quantification et analyses des marquages Fos et NeuN

Le comptage des cellules marquées pour Fos ou NeuN se fait grâce à un microscope optique motorisé et un logiciel de comptage de cellules appelé Mercator (Explora Nova, La Rochelle, France). Les sites anatomiques investigués sont basés sur un atlas stéréotaxiques (Paxinos et Watson, 1998). Pour le comptage de Fos, seuls les neurones qui expriment un niveau maximal de Fos (c'est-à-dire les noyaux les plus foncés et nets) sont pris en compte pour optimiser la précision de la mesure. Les neurones montrant une expression Fos sont comptés dans 6 coupes représentatives comportant le NBL, le NC et le cortex piriforme. Les résultats sont exprimés en nombre moyen de neurones Fos-positifs par mm² dans chaque structure en fonction du côté (Ani ou Saline). Les neurones marqués au NeuN sont comptés bilatéralement dans trois coupes représentatives montrant le NBL et le NC. Les résultats sont exprimés en nombre de neurones NeuN-positifs par mm² et comparés entre les animaux ayant reçu l'Ani et la Saline.

CatFISH

Le catFISH, pour *compartment analysis of temporal activity by fluorescence in situ hybridization*, est une technique de marquage cellulaire basée sur l'expression du gène d'activité précoce *Arc*. Elle permet de discriminer et quantifier les neurones activés par deux expériences différentes par rapport au compartiment cellulaire dans lequel l'expression d'*Arc* est visible

Après la fin de la seconde présentation (ou à un moment choisi de manière arbitraire en ce qui concerne le groupe contrôle cage) tous les rats sont euthanasiés par décapitation avec une guillotine à rongeur, les cerveaux prélevés et plongés

dans de l'isopentane refroidi par neige carbonique afin de les congeler. Ces opérations doivent être réalisées dans un délai très bref, moins de 180 secondes pour garder l'expression des gènes précoces intacte. Les cerveaux sont ensuite stockés à -70°C. Ils sont coupés en 2 dans le sens de la longueur afin de ne mener les expériences que sur la moitié droite et conserver la gauche en cas de problème. Ces moitiés de cerveau sont moulées dans trois blocs différents avec du Tissue-Tek OCT (Miles, Elkhart, IN) afin d'avoir dans chaque bloc au moins un individu de chaque groupe. Les blocs sont ensuite coupés au cryostat (Leica, Paris, France) et pour avoir des sections coronales de cerveaux d'une épaisseur de 20 µm posées sur des lames de verre qui sont ensuite stockées à -70°C. Les lames contiennent ainsi au moins une moitié de cerveaux d'individus provenant de chaque groupe.

Trois lames pour chaque structure (NBL et CI) dans chaque bloc sont utilisées pour réaliser l'immunohistochimie. Elles ont été choisies car étant les plus représentatives de ces structures (en antéropostérieur, -2.80 mm par rapport au Bregma pour le NBL et +1.20 mm par rapport au Bregma pour le CI). Les procédures d'immunohistochimie et d'hybridation *in situ* suivent celles établies par Guzowski (Guzowski et al., 1999). Les tissus sont d'abord fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pH 7.4, rincés dans du 2X SSC pH7.0 et passés dans un mélange acide acétique/TEA (TriEthanolAmine). Ils sont ensuite déshydratés à l'aide d'un mélange acétone/méthanol à 50% rincés de nouveau puis incubés avec un tampon de préhybridation (1X ; Sigma) pendant 30 minutes. Après cette préhybridation les tissus sont hybridés durant 16-18 heures à 56°C avec une sonde ARNm dirigée contre *Arc* (~100ng/100µl), marquée avec de la digoxigénine et diluée dans un tampon d'hybridation (Sigma, St Louis, MO). La sonde a préalablement été dénaturée (chaleur) et refroidie dans la glace. Les tissus sont alors rincés dans plusieurs bains toujours à 56°C, le dernier ayant une stringence de 0.5X SSC et contenant de l'ARNase A (10µg/ml) à 37°C. Les tissus sont incubés une nuit entière avec un anticorps anti-peroxydase/digoxigénine (Roche Molecular Biochemicals) à 4°C. Après une dernière série de rinçages dans une solution tampon Tris-saline (avec du Tween-20 à 0.05%) le marquage est révélé en utilisant le système de fluorescence CY3-TSA qui contient un anticorps secondaire couplé à un marqueur fluorescent. Les noyaux des neurones sont révélés avec du Sytox (Molecular Probes). Les coupes sont finalement couvertes avec un milieu limitant l'atténuation du marquage (Vectashield Mounting Media).

Acquisition d'images et analyses

Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal Leica (Leica Guadalajara, Mexique) équipé de 3 lasers, un laser argon (488 nm) et deux lasers hélium/néon (543/633 nm) et d'un objectif à immersion (40X). Grâce au microscope confocal, des sections optiques d'environ 0.3 μm d'épaisseur (regroupées en pile) sont constitués. Neuf piles adjacentes sont nécessaires pour échantillonner le NBL. Pour le CI, douze piles sont nécessaires en tout, réparties en quatre piles pour l'agranulaire, quatre pour le dysgranulaire et quatre pour le granulaire (deux piles pour la couche superficielle et deux piles pour la couche profonde). Les paramètres de contraste et d'intensité utilisés pour l'ensemble des cerveaux d'une lame sont étalonnés par rapport aux cerveaux des contrôles cage. Après l'acquisition les comptages sont réalisés à l'aide du logiciel d'imagerie Visilog (Noesis, Crolles, France). Sur la base du marquage nucléaire (Sytox), la première étape consiste à différencier les neurones de la glie afin d'écartier cette dernière de l'analyse. Les noyaux des cellules gliales sont petits avec un marquage très intense et uniforme. Seuls les neurones marqués et présent dans le plan médial de la pile (20% de l'épaisseur) sont comptés dans les analyses. Ces neurones sont caractérisés par un marquage *Arc* nucléaire (deux points rouges nets) ou cytoplasmique (entourant 60% du neurone) et visible dans au moins 3 plans consécutifs contenant le neurone. Les neurones doublement marqués (avec les critères précédents) sont aussi comptés (Figure 10. B). Les nombres totaux de neurones (marquage nucléaire au Sytox) et de neurones *Arc*-positifs sont mesurés afin d'obtenir les pourcentages totaux pour chaque type de marquage et dans chaque groupe expérimental (contrôle cage, pseudo conditionné ou conditionné). Pour prévenir tout biais, les comptages sont réalisés sans savoir à quel groupe expérimental appartiennent les cerveaux imagés.

Procédures histologiques

Dans le but de vérifier que les effets comportementaux observés après l'infusion de drogues sont bien liés à l'action de la drogue dans la zone cible et pas un autre endroit, tous les animaux ayant subi une opération chirurgicale sont euthanasiés. A la fin des expériences comportementales, les animaux sont profondément anesthésiés en recevant une injection i.p. de 1 ml de pentobarbital sodique. Après ouverture de la cage thoracique ils sont ensuite perfusés par voie intracardiaque à

l'aide d'une solution saline à 0.9%. Les cerveaux sont ensuite prélevés et placés dans des flacons contenant une solution fixatrice de paraformaldéhyde durant 24h à une température de 4°C. Passé ce délai les cerveaux sont plongés dans une solution de sucrose à 30% destinée à protéger les tissus. L'étape suivante consiste à couper des sections coronales de ces cerveaux, sections de 40µm d'épaisseur réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica, Paris, France). Les coupes sont ensuite collectées et placées à 4°C dans une solution de PBS azide (tampon phosphate contenant de l'azide qui est un antifongique). Les coupes sont enfin montées sur des lames et colorées avec du crésyl violet pour être examinées au microscope optique et vérifier le bon emplacement des guides canules. Les animaux dont un ou deux guides canules ne sont pas bien positionnés seront éliminés des analyses statistiques.

Analyses statistiques

Toutes les données sont analysées en utilisant des tests-t appariés, non appariés et des analyses de variances à un ou deux facteurs. Pour toutes ces analyses nous avons choisi de prendre $p < 0.05$ comme taux de significativité. Les facteurs analysés sont indiqués à chaque fois qu'une analyse est réalisée. Pour l'ensemble de ces analyses nous avons utilisé le logiciel d'analyses statistiques STATVIEW.

CHAPITRE 1 :

Rôle du cortex insulaire dans l'aversion olfactive et l'aversion gustative conditionnée.

Chapitre 1 : Rôle du cortex insulaire dans l'aversion olfactive et l'aversion gustative conditionnée.

Résumé de l'article

L'AOC et l'AGC sont deux apprentissages alimentaires reposant sur l'association d'un SC chimiosensoriel nouveau (odeur ou goût) avec un SI viscéral (malaise). Parce que l'AOC ne peut supporter un IIS long au contraire de l'AGC (quelques minutes contre plusieurs heures), l'odeur a longtemps été considérée comme un SC non critique comparée au goût. Jusqu'à récemment, l'odeur était utilisée en mode distal et ne stimulait que la voie olfactive orthonasale. Mais des travaux récents ont montré que l'ingestion de l'odeur (présentation proximale/distale) permettait de stimuler en plus la voie olfactive rétronasale et d'induire une AOC avec un IIS long (Slotnick et al., 1997 ; Chapuis et al., 2007). Nous avons d'abord montré qu'il était possible d'induire dans la cage d'élevage des animaux une AOC comparable à l'AGC si l'odeur est ingérée : association SC-SI unique, IIS long, et rétention importante.

Nous avons ensuite évalué si ces apprentissages possédaient des bases neurobiologiques communes. Notre attention a été retenue par le CI, structure incontournable dans l'AGC et présentant des afférences olfactives et viscérales. Les études lésionnelles n'ont à ce jour révélé aucune implication du CI dans l'AOC (Tableau 4) mais cette approche lésionnelle peut induire des réorganisations fonctionnelles palliant l'absence du CI. Une approche pharmacologique s'imposait pour bloquer le CI lors de l'acquisition, la consolidation ou les rappels récent et ancien de l'AOC et de l'AGC.

L'inactivation du CI par infusion de lidocaïne, anesthésique local, n'a aucun effet sur l'acquisition de l'AOC mais perturbe fortement celle de l'AGC. Pour étudier les mécanismes de consolidation, nous avons utilisé l'anisomycine, un inhibiteur de synthèse protéique. L'infusion d'anisomycine dans le CI n'a pas d'effet sur l'AOC, mais perturbe encore une fois l'AGC. Enfin nous montrons que l'inactivation du CI n'a pas d'effet sur les rappels, récent (2 jours) ou ancien (36 jours), de l'AOC, tandis que ceux de l'AGC sont affectés.

Ces résultats soulignent une implication différentielle du CI dans l'AOC et l'AGC : nécessaire à aucune des étapes de la formation ou du rappel de l'AOC, il est en revanche indispensable à celles de l'AGC.

1^{er} article

Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory

Desgranges Bertrand¹, Sevelinges Yannick¹, Bonnefond Mathilde^{1, 2}, Lévy Frédéric¹, Ravel Nadine² and Ferreira Guillaume¹

¹ Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, CNRS UMR6175, INRA UMR85, Université Tours, F-37380 Nouzilly, France

² Laboratoire de Neurosciences Sensorielles, Comportementales et Cognitives, CNRS UMR5020, Université Lyon I, 50 avenue Tony Garnier, F-69366 Lyon, France

Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory

Desgranges Bertrand,¹ Sevelinges Yannick,¹ Bonnefond Mathilde,^{1,2} Lévy Frédéric,¹ Ravel Nadine² and Ferreira Guillaume¹

¹Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, CNRS UMR6175, INRA UMR85, Université Tours, F-37380 Nouzilly, France

²Laboratoire de Neurosciences Sensorielles, Comportementales et Cognitives, CNRS UMR5020, Université Lyon I, 50 avenue Tony Garnier, F-69366 Lyon, France

Keywords: acquisition, amygdala, consolidation, flavour, learning, retrieval

Abstract

Conditioned odour aversion (COA) and conditioned taste aversion (CTA) result from the association of a novel odour or a novel taste with delayed visceral illness. The insular cortex (IC) is crucial for CTA memory, and the present experiments sought to determine whether the IC is required for the formation and the retrieval of COA memory as it is for CTA. We first demonstrated that ingested odour is as effective as taste for single-trial aversion learning in rats conditioned in their home cage. COA, like CTA, tolerates long intervals between the ingested stimuli and the illness and is long-lasting. Transient inactivation of the IC during acquisition spared COA whereas it greatly impaired CTA. Similarly, blockade of protein synthesis in IC did not affect COA but prevented CTA consolidation. Moreover, IC inactivation before retrieval tests did not interfere with COA memory expression when performed either 2 days (recent memory) or 36 days after acquisition (remote memory). Similar IC inactivation impaired the retrieval of either recent or remote CTA memory. Altogether these findings indicate that the IC is not necessary for aversive odour memory whereas it is essential for acquisition, consolidation and retrieval of aversive taste memory. We propose that the chemosensory stimulations modulate IC recruitment during the formation and the retrieval of food aversive memory.

Introduction

Conditioned taste aversion (CTA) and conditioned odour aversion (COA) are based on the association between the chemosensory characteristics of food [conditioned stimulus (CS)] with visceral malaise [unconditioned stimulus (US)]. Taste was long considered the critical CS for food aversion in comparison to odour (Palmerino *et al.*, 1980; Garcia *et al.*, 1985). However, it has been demonstrated more recently that when odour is mixed with water, instead of being delivered close to the solution, odour is as effective as taste for illness: it requires a single trial, resists a CS–US delay of several hours and can be recalled several weeks after acquisition (Slotnick *et al.*, 1997; Chapuis *et al.*, 2007a).

Compared with CTA (Bermudez-Rattoni, 2004), much less is known about neural bases of COA. Pharmacological studies have demonstrated the crucial role of the basolateral amygdala (BLA) in COA (Ferry *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2007; Desgranges *et al.*, 2008; Sevelinges *et al.*, 2008, 2009). Another likely site for the integration of odour with toxicosis is the insular cortex (IC) as it receives both olfactory and visceral inputs, in addition to gustatory information (Sewants & Sewants, 2001). The functional necessity of

the IC has been demonstrated in CTA (Bermudez-Rattoni, 2004), but permanent IC lesion did not affect COA (Kiefer *et al.*, 1982, 1984; Lasiter *et al.*, 1985; Roman *et al.*, 2006). However, we have recently reported in rats using electrophysiological recordings that the IC is specifically activated by a tasteless odour after COA conditioning (Chapuis *et al.*, 2007b). In addition, temporary inactivation of the IC impaired the learning of an odour–odour association task, the social transmission of food preferences (Fortis-Santiago *et al.*, 2008). This olfactory learning impairment was induced by transient IC inactivation whereas the absence of COA impairment was obtained after permanent IC lesion. Because functional recovery after lesion could challenge the normal involvement of the IC in COA, we propose to reinvestigate the importance of IC in COA memory formation and retrieval using transient pharmacological manipulations. According to the importance of IC in CTA memory (Bermudez-Rattoni, 2004), we compare the effects of IC manipulations on COA and CTA.

The experimental framework used in COA studies (experimental chamber outside the home cage, operant/instrumental conditioning; Slotnick *et al.*, 1997; Chapuis *et al.*, 2007a) was quite different from the one generally used in CTA studies (home cage with free access to CS). Therefore, we first assessed in the same experimental condition, i.e. the home cage with free access to bottles during conditioning and test, whether the ingested odour is as effective as taste for single-trial aversion learning with long CS–US intervals. Then, we evaluated the

Correspondence: Dr F. Guillaume, as above.
E-mail: fguill@univ-tours.fr

Received 6 November 2008, revised 21 January 2009, accepted 15 February 2009

CHAPITRE 2 :

Rôle de l'amygdale basolatérale dans la formation et le rappel l'aversion olfactive conditionnée.

Chapitre 2, 1^{ère} partie : rôle du noyau basolatérale de l'amygdale dans l'acquisition et le rappel de l'aversion olfactive conditionnée

Résumé de l'article

Le premier chapitre a révélé que le CI n'était pas nécessaire aux différentes étapes de l'AOC. En continuant à investiguer les bases neurobiologiques de l'AOC, nous nous sommes focalisés sur une autre structure de convergence des informations olfactives et viscérales, déjà connue pour jouer un rôle dans les apprentissages olfactifs, le NBL. Les études lésionnelles montrent que ce NBL est important pour l'AOC (Tableau 4), sans toutefois préciser à quel moment de l'apprentissage. Nous avons utilisé une approche pharmacologique, avec le muscimol, agoniste des récepteurs GABA α , pour bloquer l'activité excitatrice du NBL durant l'acquisition et les rappels récents et anciens de l'AOC.

L'infusion de muscimol dans le NBL avant la présentation de l'odeur, perturbe fortement l'AOC. Mais cette même infusion réalisée entre le SC et le SI n'a aucun effet sur l'AOC, suggérant que le NBL est important pour le traitement du SC mais pas du SI ou de l'association SC-SI. Le fait que l'inactivation du NBL avant la présentation de l'odeur perturbe l'acquisition de l'inhibition latente confirme l'importance de cette structure dans l'encodage de l'odeur. Enfin les infusions de muscimol dans le NBL affectent le rappel récent (2 jours) mais plus fortement le rappel ancien (28 jours) de l'AOC, ce qui laisse penser que le NBL serait impliqué à très long terme dans l'AOC. Par ailleurs, l'inactivation du NBL ne perturbe ni la perception olfactive, ni l'expression d'une aversion spontanée (pour la quinine). De plus les effets de l'inactivation du NBL sur l'AOC ne sont pas la conséquence d'un apprentissage sous dépendance d'état.

Ces résultats suggèrent que le NBL est nécessaire à l'encodage et au rappel d'une mémoire olfactive. Précisément, le NBL apparaît particulièrement critique pour le traitement du SC olfactif. De plus, le NBL semble jouer un rôle permanent dans l'expression de l'AOC et pourrait être l'une des bases neurobiologiques sous-tendant le stockage à long terme de la mémoire olfactive.

2^{ème} article

The basolateral amygdala is necessary for the encoding and the expression of odor memory

Yannick Sevelinges, Bertrand Desgranges, and Guillaume Ferreira

Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, CNRS UMR6175, INRA UMR85, Université Tours, F-37380 Nouzilly, France

The basolateral amygdala is necessary for the encoding and the expression of odor memory

Yannick Sevelinges, Bertrand Desgranges, and Guillaume Ferreira¹

Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, CNRS UMR6175, INRA UMR85, Université Tours, F-37380 Nouzilly, France

ABSTRACT

Conditioned odor avoidance (COA) results from the association between a novel odor and a delayed visceral illness. The present experiments investigated the role of the basolateral amygdala (BLA) in acquisition and retrieval of COA memory. To address this, we used the GABA_A agonist muscimol to temporarily inactivate the BLA during COA acquisition or expression. BLA inactivation before odor-malaise pairing greatly impaired COA tested 3 d later. In contrast, muscimol microinfusion between odor and malaise spared retention. Moreover, inactivation of the BLA before pre-exposure to the odor prevented latent inhibition of COA. This suggests that neural activity in the BLA is essential for the formation of odor representation. BLA inactivation before the retrieval test also blocked COA memory expression when performed either 3 d (recent memory) or 28 d (remote memory) after acquisition. This effect was transitory as muscimol-treated animals were not different from controls during the subsequent extinction tests. Moreover, muscimol infusion in the BLA neither affected olfactory perception nor avoidance behavior, and it did not induce a state-dependent learning. Altogether, these findings suggest that neural activity in the BLA is required for the encoding and the retrieval of odor memory. Moreover, the BLA seems to play a permanent role in the expression of COA.

Considerable evidence indicates that the amygdala, and more particularly, the basolateral nucleus of the amygdala (BLA), is necessary for aversive and emotional memories in rats and humans (for reviews, see McGaugh 2004; Phelps and LeDoux 2005). Numerous studies suggest that the BLA is involved in the formation of affective memory, but whether the amygdala stores such memory is controversial. Results of studies using fear conditioning support the view that essential aspects of learning take place in the BLA, which subserves long-term storage of fear memory (for review, see Phelps and LeDoux 2005). In particular, lesion studies showed that the BLA has a permanent role in the expression of learned fear (Maen et al. 1996; Gale et al. 2004). On the other hand, it has been suggested for inhibitory avoidance that the BLA is not the site of memory storage, but rather a region that is only temporarily required after training (for review, see McGaugh 2004). Consistent with this idea, the BLA is important for recent (1 d) but not for remote (6–10 d) memory retrieval of inhibitory avoidance (Liang et al. 1982, 1996; Izquierdo et al. 1997).

The importance of BLA has also been investigated in conditioned taste avoidance (CTA) and conditioned odor avoidance (COA), in which animals learn to avoid a taste or an odor, respectively (the conditioned stimulus, CS), previously paired with a visceral malaise (the unconditioned stimulus, US) (for reviews, see Garcia et al. 1985; Bures 1998; Batselland Blankenship 2002). Taste was long considered the critical CS for food avoidance in comparison to odor (Palmerino et al. 1980; Garcia et al. 1985). However, it has been demonstrated more recently that when odor is mixed with water (inducing primarily retronasal detection), instead of being delivered close to the solution (inducing only orthonasal detection), odor is as effective as taste for illness: It requires a single trial, resists a CS-US delay of several hours, and can be recalled several weeks after acquisition (Slotnick et al. 1997; Chapuis et al. 2007a). Lesion or pharmacological manipulation of the BLA impaired CTA acquisition and recent memory retrieval

(Gallo et al. 1992; Yamamoto et al. 1995; Morris et al. 1999; Yasoshima et al. 2000), despite the exact role of amygdala in CTA, which still remains to be solved (for reviews, see Lamprecht and Dudai 2000; Reilly and Bornavolova 2005). Concerning COA, lesion or reversible inactivation of the entire amygdala before COA impaired acquisition (Bermudez-Rattoni et al. 1983, 1986), while pharmacological stimulation of the BLA immediately after the CS presentation enhanced the COA acquisition (Ferry and Di Scala 1997). These results were based on orthonasal perception (odor on a disc), and it has to be evaluated whether similar findings can be obtained with COA based on retronasal perception (ingested odor). Moreover, these studies point to the importance of the BLA in COA memory formation; however, no evidence to date allows us to differentiate the role of the BLA in the different mnemonic phases, i.e., CS processing, US processing, or CS-US association. It remains to be established whether post-CS inactivation induced similar COA impairment as pre-CS inactivation and whether BLA neural activity is also necessary for the encoding of a nonassociative odor memory. Furthermore, it has to be elucidated whether the BLA is essential for retrieval of recent and remote COA memory in order to evaluate whether this area plays a temporary or permanent role in the expression of COA.

For this purpose, we first evaluated the effect of temporary inactivation of the BLA on acquisition of COA (based on ingested odor) by local infusions of the GABA_A agonist muscimol (Mus) either before odor-malaise pairing (pre-CS) or between odor and malaise (post-CS). To further investigate the role of the BLA in the encoding of odor memory, the BLA was inactivated before exposure to ingested odor in an incidental learning. Finally, we assessed the effect of BLA inactivation on the retrieval of recent (3 d) and remote (28 d) COA memory.

Results

Inactivation of the BLA blocks the acquisition of new odor memory

We first evaluated in which stage of COA acquisition the BLA is involved. For this purpose, rats were implanted with bilateral

¹Corresponding author.

E-mail: ferreira@tours.inra.fr; fax: 33-2-47-42-77-43.

Article is online at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.1247609>.

Chapitre 2, 2^{ème} partie : Le NBL dans la consolidation de l'AOC

Résumé de l'article

Si le NBL est important pour l'acquisition et le rappel de l'AOC (cf. étude précédente), la question de son implication dans la consolidation n'a pas encore été explorée. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, l'utilisation de l'anisomycine permet de bloquer la synthèse protéique nécessaire à la consolidation d'une mémoire. Nous avons donc infusé de l'anisomycine au sein du NBL à différents moments pour mesurer son importance dans la consolidation de l'AOC.

Réalisée avant la présentation du SC, l'infusion perturbe fortement l'AOC. Par contre, juste après le SC, cela n'a aucun effet. Ces résultats suggèrent que l'anisomycine provoque des déficits dans la formation de la représentation de l'odeur ou de l'association SC-SI plutôt que dans l'intégration du SI. L'infusion d'anisomycine dans le NBL avant le SC affecte fortement la mémoire à long terme mais pas la mémoire à court terme indiquant une atteinte spécifique de la consolidation de l'AOC. L'infusion d'anisomycine dans le NBL ne perturbe ni le fonctionnement du NBL, ni la perception olfactive et n'entraîne aucune mort cellulaire au sein de l'amygdale. Cette intervention pharmacologique induit une diminution importante et localisée de la synthèse protéique puisque l'expression de la protéine Fos dans le NBL et le noyau central de l'amygdale, mais pas dans le cortex piriforme adjacent, décroît de 65-70%.

Ensemble, ces résultats suggèrent que la synthèse protéique dans le NBL, et éventuellement dans le noyau central, est nécessaire à la consolidation de l'AOC.

3^{ème} article

Anisomycin infusion in the amygdala impairs consolidation of odor aversion memory

Bertrand Desgranges, Frédéric Lévy and Guillaume Ferreira

Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, CNRS UMR6175, INRA UMR85, Université Tours, F-37380 Nouzilly, France

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.

Brain Research



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>

CHAPITRE 3 :

Mise en place d'un modèle comportemental de préférence olfactive conditionnée et implication du noyau basolatérale de l'amygdale et du cortex insulaire.

Chapitre 3 : Mise en place d'un modèle comportemental de préférence olfactive conditionnée et implication du noyau basolatérale de l'amygdale et du cortex insulaire.

Résumé de l'article

Les deux premiers chapitres de la thèse ont mis en évidence le poids considérable du NBL dans les différentes étapes de l'AOC et l'absence d'implication du CI quelle que soit l'étape de l'apprentissage. La littérature existante fait état d'une dissociation similaire au sujet de la POC : la lésion du NBL, mais pas du CI, perturbe la POC. En utilisant une technique d'imagerie cellulaire, nous avons fait l'hypothèse que des mécanismes de plasticité pourraient être mis en évidence dans le NBL mais pas le CI.

Nous avons pour cela utilisé la technique du catFISH permettant de visualiser l'impact de deux stimulations, odeur et goût, sur l'expression du gène Arc au sein des mêmes neurones. Sur la base du postulat de Hebb (« *neurons that fire together wire together* », 1949), nous avons fait l'hypothèse que l'apprentissage de la POC devrait renforcer la connexion entre les populations de neurones répondant à l'odeur et au goût au sein du NBL, mais pas du CI, et donc augmenter la population de neurones répondant conjointement aux deux stimulations.

Alors que 3 ou 6 associations d'une odeur avec du sucrose n'engendrent pas une POC fiable, 9 associations conduisent à une préférence flagrante. Les résultats du catFISH révèlent que cette association répétée quadruple la population de neurones répondant aux deux stimulations odeur et goût au sein du NBL mais pas du CI (les résultats du CI restent à confirmer sur un plus grand nombre d'animaux). Cette augmentation de neurones doublement activés s'expliquerait par le recrutement d'une nouvelle population.

Cette augmentation de la convergence des informations olfacto-gustatives au sein du NBL après l'apprentissage serait un des mécanismes de plasticité cellulaire à la base de la POC et plus généralement des apprentissages olfactifs alimentaires.

4^{ème} article

Flavor preference learning increases olfactory and gustatory convergence onto single neurons in basolateral amygdala but not in insular cortex.

Desgranges Bertrand^{1°}, Ramirez-Amaya Victor^{2°}, Ricaño-Cornejo Itzel ², Lévy Frédéric¹ & Ferreira Guillaume^{1*}

¹ Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, INRA UMR85, CNRS UMR6175, Université Tours, F-37380 Nouzilly, France.

² Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, UNAM, AP 1-1141, 76001 Querétaro, México.

Bertrand Desgranges, Frédéric Lévy and Guillaume Ferreira

Flavor preference learning increases olfactory and gustatory convergence onto single neurons in basolateral amygdala but not in insular cortex.

Abbreviated title: Odor-taste convergence onto amygdala neurons

Desgranges Bertrand^{1°}, Ramirez-Amaya Victor^{2°}, Ricaño-Cornejo Itzel ², Lévy Frédéric¹ & Ferreira Guillaume^{1*}

¹ Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, INRA UMR85, CNRS UMR6175, Université Tours, F-37380 Nouzilly, France.

² Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, UNAM, AP 1-1141, 76001 Querétaro, México.

[°] These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Ferreira Guillaume, Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, INRA UMR85, CNRS UMR6175, Tours University, F-37380 Nouzilly, France.

Phone : +33 2 47 42 79 74 ; Fax : +33 2 47 42 77 43 ; Email : ferreira@tours.inra.fr

Number of pages: 12

Number of figures: 3

Number of tables: 0

Number of words: the whole manuscript < 4500; Abstract: 172; Introduction: 396; Discussion: 738

Keywords: food memory; odor; taste; association; conditioning.

Acknowledgements: This work was supported by AROMALIM Grant Agence National de la Recherche ANR-05-PNRA-002. We thank Claude Cahier and Jean-Claude Braguer for the care they provided to the animals during the experiments and Claire Dawson for the English revision of the final text. Bertrand Desgranges was supported by a PhD grant from INRA-Région Centre.

Abstract

Perception of flavor relies on olfactory and gustatory information which converge in the amygdala and the ventrolateral frontal cortex in mammals. Yet identification of neurons that respond to such coincident input during a flavor experience remains unclear. The present study used Arc cellular compartmental analysis of temporal gene transcription by fluorescence in situ hybridization (catFISH) to visualize odor-taste convergence onto single neurons in basolateral amygdala (BLA) and insular cortex (IC) and to assess a possible enhancement of coincident activation after odor-taste associations. We used in rats a sucrose conditioned odor preference as a flavor experience in which 9 odor-sucrose pairings induce a reliable odor-taste association. The results show that flavor experience induced a four-fold increase of the percentage of cells activated by both taste and odor stimulations in BLA but not in IC. This greater odor-taste convergence onto individual neurons is interpreted as the recruitment of a new population that can be activated by each stimulation thereafter. Convergent odor-taste inputs onto basolateral amygdala neurons may support associative plasticity underlying flavor memory.

Introduction

During food intake, smell and taste interaction participate in the perception of flavor (for review: Shepherd, 2006). Olfactory and gustatory information are each subserved by different receptors and different neural systems but they converge in the amygdala and the ventrolateral frontal cortex in mammals (for review: Rolls, 2006; Shepherd, 2006; Small and Prescott, 2005). More precisely, the basolateral amygdala (BLA) and the insular cortex (IC) represent two major areas in rodents for the integration of odor-taste associations as they receive both olfactory and gustatory afferents, in addition to visceral inputs (for reviews: Lamprecht and Dudai, 1997; Saper, 1982; Shipley and Ennis, 1996; Sowards & Sowards, 2001). However, cellular mechanisms of odor-taste interactions are not clearly demonstrated. We hypothesize that odor-taste convergence occurs onto single neurons in BLA and IC and that a previous odor-taste association increases this convergence.

Lesion studies provide information about a differential role played by BLA and IC in the processing and/or memory of odor-taste association. Using conditioned odor preference (COP) as odor-taste association learning, recent studies indicate that amygdala lesion (including BLA) strongly impaired COP induced by repeated association of an odor with a sweet taste (saccharin, fructose or sucrose; Gilbert et al., 2003; Sakai & Yamamoto, 2001; Touzani and Sclafani, 2005), whereas IC lesion did not affect this associative learning (Sakai & Yamamoto, 2001; Touzani and Sclafani, 2007). Although odor and taste inputs converge in BLA and IC, the differential effect of BLA and IC lesions on COP led us to hypothesize that COP increased odor-taste convergence onto single neurons in the BLA but not in the IC.

To test these hypotheses, we used sucrose-COP as a flavor experience in rats. We first demonstrated the effectiveness of this procedure to induce a reliable odor-taste association after 9 odor-sucrose pairings, in comparison to 9 unpaired presentations. We then used a powerful imaging method, *Arc* cellular compartmental analysis of temporal gene transcription by fluorescence *in situ* hybridization (catFISH) (for review: Guzowski et al., 2005), to visualize, within a single brain, neuronal populations engaged by two distinct stimulations, odor and taste. In addition, this addresses how much overlap occurs in these neuronal populations (i.e. odor-taste convergence) in BLA and IC following COP training. We demonstrated that flavor experience increased the neuronal representation of either odor or taste in the BLA,

but not in the IC, by recruiting a new population presenting coincident odor-taste activation.

Materials and methods

Subjects. Male Wistar rats were used (~60 days old, 270-320g; Janvier, France). They were housed individually in polypropylene cages (34 x 29 x 17 cm) lined with abundant pine shavings and kept in a temperature (23°C) and light (7h00-19h00) controlled room. Food and water were provided *ad libitum* until the beginning of the behavioral procedure. Experiments were performed in accordance with French and European regulations concerning animal experimentation, including authorizations 006352 and A37801 from the French Ministry of Agriculture to perform experiments, and ECC directive 86/609/EEC.

Behavioral procedure. Four days before the beginning of conditioning, rats were adapted to a water restriction schedule with two daily drinking sessions in their home cage from 10:00 to 10:30 am and from 4:00 to 4:30 pm. Then, the Paired group received either 3 (n=10), 6 (n=9) or 9 (n=10) daily presentations of a solution containing the odorant and tasteless isoamyl acetate (0.01%; banana scented solution; Sigma, France; Slotnick et al., 1997) mixed with the sweet taste sucrose (0.1M, 3.4%; Sigma, France) both diluted in water, during either the morning or the afternoon drinking session. They received water during the other daily session. The Unpaired group received either 3 (n=7), 6 (n=9) or 9 (n=10) daily presentations of the banana-scented solution (0.01% isoamyl acetate diluted in water) during either the morning or the afternoon drinking session and the sweet solution (0.1M sucrose diluted in water) during the other daily session. The day after the end of training, COP was assessed in Paired and Unpaired groups by providing a two-bottle test during both the morning and the afternoon drinking sessions. This consisted in a simultaneous choice between one bottle containing banana-scented water and another one containing plain water in order to evaluate the COP. The left/right position of the scented solution was reversed between the morning and the afternoon session.

Because a reliable odor-taste association was obtained after 9 odor-sucrose pairings, we used this behavioral procedure for the catFISH experiment. The day

after the end of training, Paired and Unpaired animals (n=6 in each group) had access first to 6 ml of the banana-scented water (0.01% isoamyl acetate diluted in water) during 5 min, followed 25 min later by 5 min access to 6 ml of the sucrose solution (0.1M sucrose diluted in water). The volume proposed was limited to 6 ml to ensure that all animals consumed the same amount of solution and thus received similar olfactory and gustatory stimulations. The taste sucrose was deliberately not presented before the banana odor in order to avoid that the reinforcing properties and the lasting post-ingestive consequences of sucrose interfere with the following odor stimulation. In order to establish the basal level of *Arc* expression during the catFISH experiment, an additional caged control group (Caged, n=4) was used. It was constituted of animals that remained in their home cage undisturbed with food and water *ad libitum*. They were sacrificed at the same time as Paired and Unpaired groups.

In situ hybridization and confocal analysis. Immediately after sucrose presentation on day 10, brains were rapidly extracted, flash frozen in isopentane equilibrated in ethanol-dry ice slurry. The average time between the end of the sucrose presentation period to freezing the brain was always <200 s, ensuring that the killing procedure did not induce detectable *Arc* transcription. The brains were stored at -80°C. Before sectioning, brains hemisections containing the amygdala and insular cortex from the 16 rats were molded in blocks with Tissue-Tek OCT compound (Sigma, France), such that each block contained at least one brain from each group of rats (i.e. Paired, Unpaired and Caged groups). Blocks were sectioned into 20- μ m coronal sections using a cryostat (Leica, Paris, France) at -18°C, captured on slides and stored at -70°C. Regions containing complete IC (+1.2 mm from Bregma; Paxinos and Watson, 1998) and BLA (-2.8 mm from Bregma) were selected for *in situ* hybridization. Digoxigenin-labeled *Arc* riboprobes were generated from a modified cDNA plasmid (kindly provided by P. Worley) and fluorescent *in situ* hybridization for *Arc* was carried out as described elsewhere (Guzowski et al., 1999). *Arc* signal was visualized using the Cyanine 3 TSA fluorescence system (Perkin-Elmer Life Sciences, Emeryville, CA) and the nuclei were counterstained with Sytox green (Molecular Probes, Eugene, OR). Three sections of each block were selected from BLA and two from IC areas per rat. Images were acquired using a Leica SL confocal microscope with a 40X objective lens using helium/neon and argon lasers. Z-series stacks (approximately 0.3 μ m-thick optical sections) were constructed using Visilog

software. For each rat, nine stacks were realized for each section of the BLA to sample the maximum of the nucleus (see Fig 1A), and twelve stacks were realized for each section of the IC: four stacks in granular zone, four in dysgranular zone and four in agranular zone (for each zone two stacks in the deep layer and two stacks in the superficial layer; Fig 1B). On the basis of the nuclear counterstain, neurons and glia were discriminated. Glial nuclei were small, with intense and uniform RNA staining. Only neuron-like cells found in the middle 20% of the stacks were included in analysis. Positive neurons had two intense internuclear foci or cytoplasmic staining surrounding at least 60% of the cell or both types of staining, visible in at least three plans together with the cell nucleus. The results were expressed as a percentage of the total neuronal nuclei analyzed. The mean number of cells counted was not different between groups for BLA (638 ± 84 , 678 ± 39 and 610 ± 31 for Caged, Unpaired and Paired groups, $F_{(2,12)} < 1$). At present, only 7 out of 16 animals were processed for IC (3/4 Caged, 2/6 Unpaired and 2/6 Paired animals; 1129 ± 48 , 1149 ± 32 and 1198 ± 72 for Caged, Unpaired and Paired groups). To prevent bias, the experimenter was unaware of the relationship between the images and the behavioral conditions they represented. Careful optical dissecting was done to ensure that only neurons with fully intact nuclei were scored.

Results

Behavioral evidence of conditioned odor preference.

We tested whether repeated paired presentations of banana odor and sucrose induced COP for banana odor, in comparison to unpaired presentations. After 3 or 6 days of training, no clear preference for banana-scented water was induced (data not shown). However, after 9 days of training, Paired group preferred banana-scented water over plain water (paired t-test, $t_{(9)}=4.0$, $p=0.003$) whereas Unpaired group preferred plain over odorized water ($t_{(9)}=2.8$, $p=0.02$; Fig 2B). These results indicate that 9 paired presentations of odor and sweet taste induce a reliable odor-taste association.

Odor-taste association learning increased the coincident activation of individual neurons by odor and taste in the BLA, but not in the IC.

We tested whether repeated paired presentations of banana odor and sucrose increased the number of neurons that respond to both stimulations in BLA and IC using catFISH analysis. After 9 days of training, Paired and Unpaired animals were exposed first to banana-scented water for 5 min followed 25 min later to sucrose for 5 min and they were sacrificed immediately after sucrose presentation (Fig. 2A). All the Paired and Unpaired animals consumed the 6 ml of banana-scented water and sucrose proposed. Cells responsive to the first stimulation (banana odor) showed *Arc* staining restricted to the cytoplasm whereas cells responsive to the last stimulation (taste sucrose) showed *Arc* staining restricted to the nucleus in the form of two intense dots (Fig 2C a and b). Cells responsive to both stimuli (odor and taste) were marked by both cytoplasmic and nuclear staining (Fig. 2C c).

A significant difference between groups was revealed concerning the percentage of BLA neurons showing cytoplasmic (cytoplasmic staining only + double staining; $F_{(2,12)}=11.7$, $p=0.001$) and nuclear staining (nuclear staining only + double staining; $F_{(2,12)}=18.9$, $p=0.0002$; Fig. 3A). Fisher's post-hoc tests revealed that Paired and Unpaired groups presented a higher percentage of activated neurons compared to Caged group for each staining ($p<0.01$ for each comparison) indicating that drinking banana-scented water or sucrose induced a significant BLA activation. Moreover, Paired group showed a higher percentage of BLA neurons responding to the first stimulation or to the second stimulation compared to Unpaired group ($p=0.057$ and $p=0.005$, respectively; Fig. 3A). These results indicate that a higher number of BLA

neurons responded to banana odor or to sucrose in Paired group than in Unpaired group.

A significant difference between groups was also revealed when the analysis was restricted to the percentage of neurons with cytoplasmic staining only ($F_{(2,12)}=8.0$, $p=0.006$), nuclear staining only ($F_{(2,12)}=7.8$, $p=0.007$), and double staining ($F_{(2,12)}=27.9$, $p<0.0001$; Fig 3B). Paired and Unpaired groups showed a higher percentage of activated neurons compared to Caged group for each condition ($p<0.01$ for each comparison, except for double staining in Unpaired group, $p=0.07$). The percentage of neurons with either cytoplasmic staining only or nuclear staining only did not differ between Paired and Unpaired groups ($p=0.48$ and $p=0.39$, respectively; Fig. 3B). Interestingly, the percentage of neurons with both cytoplasmic and nuclear staining was four times higher in Paired group compared to Unpaired group ($p<0.0001$; Fig. 3B). This indicates that the percentage of neurons in the BLA responding to both olfactory and taste stimuli increased after COP learning.

A within-group comparison indicates a higher percentage of neurons with cytoplasmic staining than with nuclear staining in Paired and Unpaired groups (paired t-test, $t_{(5)}=2.5$, $p=0.055$, $t_{(5)}=3.7$, $p=0.014$, respectively; Fig. 3A). This indicates that odor induced a higher *Arc* stimulation of the BLA than taste.

Because only a subset of animals was processed for IC, no statistical analysis was performed. However, no clear difference was observed between Paired and Unpaired groups for either cytoplasmic or nuclear staining (Fig. 3 C, D).

Discussion

We show using *Arc* catFISH as a functional imager to visualize neuronal populations activated by two discrete sensory stimulations, that flavor experience increased the neuronal representation of both odor and taste in the BLA, but not in the IC. The underlying mechanisms in the BLA involved a four-fold increase of neuronal populations presenting coincident odor-taste activation. Because there was no change in the populations activated by a single stimulation only (odor or taste) after flavor experience, this greater odor-taste convergence onto individual neurons is interpreted as the recruitment of a new population.

Although odor and taste inputs converge in BLA and IC (for reviews: Lamprecht and Dudai, 2000; Saper, 1982; Shipley and Ennis, 1996; Swards & Swards, 2001),

lesions studies indicate that amygdala, and specifically BLA, is required for COP (Gilbert et al., 2003; Sakai & Yamamoto, 2001; Touzani and Sclafani, 2005) whereas IC is not necessary (Sakai & Yamamoto, 2001; Touzani and Sclafani, 2007). Similarly, at the cellular level, the present study shows that COP training increased the neuronal population responding to both odor and taste in BLA, but not IC. This suggests that odor-taste convergence onto individual BLA neurons could be a cellular basis of flavor associative memory.

Stimulus convergence in BLA neurons promoted by associative learning was also reported in conditioned taste aversion (Barot et al., 2008) and auditory fear conditioning (Blair et al., 2001, 2003). These data reported that population responding to only one stimulus before conditioning becomes responsive to both stimuli during or immediately after associative learning. Consequently, the adding of a new population with coincident activations was not reported. Here we found that COP did not change the neural ensembles responding to only one stimulus (either odor or taste) in BLA whereas it increased the neuronal population showing concurrent activation by odor and taste. This strongly suggests that a new population appears during COP. In this scenario, this new population would not receive any (or weak) inputs of both odor and taste stimuli before COP training. When the odor or the taste is presented alone it fails to excite these BLA neurons (as evidenced by results of Unpaired group; Fig 3B). However, during COP training, when both stimuli were combined these neurons become excited by summation of stimulations, resulting in odor-taste convergence. After repeated odor-taste associations, each stimulus alone is sufficient to activate these neurons (Paired group; Fig. 3B). Our results suggest a different mechanism of associative plasticity in comparison to the one reported in taste aversion and fear conditioning (Barot et al., 2008; Blair et al., 2001, 2003). Whether the difference is due to the memory phase investigated (retrieval versus acquisition) or the type of training (9 spaced sessions for COP versus one session for the other aversive paradigms) remains to be clearly established.

There is more cytoplasmic than nuclear activations in BLA in animals that received unpaired presentations of odor and sweet taste suggesting a higher neuronal representation for odor in BLA in comparison to taste. Similar findings were obtained for the Paired group suggesting COP training did not attenuate the higher activation induced by odor. This could be due to the order of sensory presentation,

the first stimulation (odor) inducing more Arc activation because of higher arousal and drinking motivation. However there was no such difference between odor and sweet taste activations in IC. In addition, similar Arc activation was reported for sweet taste stimulations whatever the order of presentation in taste aversion conditioning (Barot et al., 2008). This suggests that odor induces a higher BLA activation than taste. This could be related to the fact that BLA is more important for odor learning than for taste learning. Lesion or inactivation of the BLA induced greater impairment in odor than taste aversion learning (Bahar et al., 2003; Bermudez et al., 1983, 1986; Desgranges et al., 2008; Fernandez-Ruiz et al., 1993; Ferry et al., 1995; Ferry et Di Scala, 2000; Hatfield et al., 1992; Hatfield et Gallagher, 1995; Miranda et al., 2007, 2008) and in odor than taste preference learning (Touzani & Sclafani, 2005).

Arc gene is involved in the plasticity that underlies memory formation. Disruption of Arc expression by antisense or knock out technologies leads to a disruption of long term memory (Guzowski et al., 2000; Plath et al., 2006). In the present study, Arc expression in BLA neurons with coincident odor-taste activation was boosted by previous learning of odor-taste association providing a cellular basis of flavor associative memory.

References

- Bahar A, Samuel A, Hazvi S, Dudai Y (2003) The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *Eur J Neurosci* 17:1527-1530.
- Barot SK, Kyono Y, Clark EW, Bernstein IL (2008) Visualizing stimulus convergence in amygdala neurons during associative learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:20959-20963.
- Bermudez-Rattoni F, Rusiniak KW, Garcia J (1983) Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste is disrupted by application of novocaine into amygdala. *Behav Neural Biol* 37:61-75.
- Bermudez-Rattoni F, Grijalva CV, Kiefer SW, Garcia J (1986) Flavor-illness aversions: the role of the amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiol Behav* 38:503-508.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learn Mem* 8:229-242.
- Blair HT, Tinkelman A, Moita MA, LeDoux JE (2003) Associative plasticity in neurons of the lateral amygdala during auditory fear conditioning. *Ann N Y Acad Sci* 985:485-487.
- Desgranges B, Levy F, Ferreira G (2008) Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory. *Brain Res*.

- Fernandez-Ruiz J, Miranda MI, Bermudez-Rattoni F, Drucker-Colin R (1993) Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. *Behav Neural Biol* 60:189-191.
- Ferry B, Sandner G, Di Scala G (1995) Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste-potentiated odor aversion. *Neurobiol Learn Mem* 64:169-180.
- Ferry B, Di Scala G (2000) Basolateral amygdala NMDA receptors are selectively involved in the acquisition of taste-potentiated odor aversion in the rat. *Behav Neurosci* 114:1005-1010.
- Gilbert PE, Campbell A, Kesner RP (2003) The role of the amygdala in conditioned flavor preference. *Neurobiol Learn Mem* 79:118-121.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene *Arc* in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2:1120-1124.
- Guzowski JF, Lyford GI, Stevenson GD, Houston FP, Mcgaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent *arc* protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993-4001.
- Guzowski JF, Timlin JA, Roysam B, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA (2005) Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Curr Opin Neurobiol* 15:599-606.
- Hatfield T, Graham PW, Gallagher M (1992) Taste-potentiated odor aversion learning: role of the amygdaloid basolateral complex and central nucleus. *Behav Neurosci* 106:286-293.
- Hatfield T, Gallagher M (1995) Taste-potentiated odor conditioning: impairment produced by infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist into basolateral amygdala. *Behav Neurosci* 109:663-668.
- Lamprecht R and Dudai Y (2000) The amygdala in conditioned taste aversion: It's there, but where. In *The amygdale* (JP Aggleton Eds.), Oxford University Press, Oxford.
- Miranda MA, Ferry B, Ferreira G (2007) Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 88:260-263.
- Miranda MI, Rodriguez-Garcia G, Reyes-Lopez JV, Ferry B, Ferreira G (2008) Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiol Learn Mem* 90:54-61.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic.
- Plath N et al. (2006) *Arc/Arg3.1* is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52:437-444.
- Reilly S, Bornovalova MA (2005) Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neurosci Biobehav Rev* 29:1067-1088.
- Rolls ET (2006) Brain mechanisms underlying flavour and appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1123-1136.
- Sakai N, Yamamoto T (2001) Effects of excitotoxic brain lesions on taste-mediated odor learning in the rat. *Neurobiol Learn Mem* 75:128-139.
- Saper CB (1982) Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J Comp Neurol* 210:163-173.

- Sewards TV, Swards MA (2001) Cortical association areas in the gustatory system. *Neurosci Biobehav Rev* 25:395-407.
- Sherpherd GM (2006) Smell images and the flavour system in the human brain. *Nature* 444.
- Shiple MT, Ennis M (1996) Functional organization of olfactory system. *J Neurobiol* 30:123-176.
- Slotnick BM, Westbrook F, Darling FMC (1997) What the rat's nose tells the rat's mouth: Long delay aversion conditioning with aqueous and potentiation of taste by odors. *Animal learning & behavior* 25:357-369.
- Small DM, Prescott J (2005) Odor/taste integration and the perception of flavor. *Exp Brain Res* 166:345-357.
- Touzani K, Sclafani A (2005) Critical role of amygdala in flavor but not taste preference learning in rats. *Eur J Neurosci* 22:1767-1774.

Figure legend

Figure 1. Schematic drawing of brain sections assayed at the level of the basolateral amygdala (A) and the insular cortex (B). Each red square represents a stack. For each rat, nine stacks were realized for each section of the basolateral amygdala (A), and twelve stacks for each section of the insular cortex (B). Figures are adapted from Paxinos & Watson, 1998.

(A) Ba: basal nucleus of amygdala; Ce: central nucleus of amygdala; La: lateral nucleus of amygdala. (B) Ai: agranular zone of insular cortex; Di: dysgranular zone of insular cortex; Gi: granular zone of insular cortex.

Figure 2. (A) Schematic of the procedure used for behavioral and catFISH studies. (B) Conditioned odor preference in Paired and Unpaired groups. (C) Representative image from basolateral amygdala showing Arc localization following stimulus presentation in a Paired animal. a) Neuron responding only to the earlier odor shows Arc staining (in red) in the cytoplasm surrounding the nucleus (counterstained green). b) Neuron responding only to the later taste shows dense Arc foci within the nucleus. c) Neuron responding to both odor and taste shows cytoplasmic and nuclear staining. (Scale bar, 10 μ m).

** , * : intra-group difference ($p < 0.01$; $p < 0.05$).

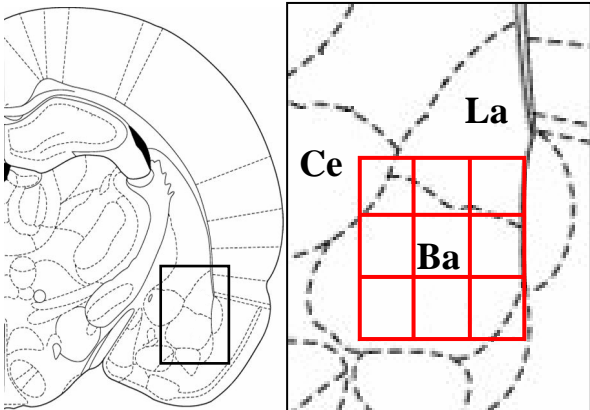
Figure 3. Percentage of Arc positive neurons in basolateral amygdala (A,B) and insular cortex (C,D) activated by odor and taste. Cytoplasmic responses correspond to the odor event and nuclear responses correspond to the taste event in Paired and Unpaired groups. Paired group shows a higher percentage of Arc positive neurons activated by either odor or taste in basolateral amygdala (A) but not insular cortex (C). In basolateral amygdala, no difference between Paired and Unpaired groups was observed in neurons activated by odor only or taste only whereas a four-fold increase was revealed in Paired group (B). By contrast, no change between Paired and Unpaired groups was observed in insular cortex (D). Caged animals remained in their home cage undisturbed to establish the basal level of Arc expression. Data are represented as means \pm SEM.

***, **, * : difference between Paired and Unpaired groups ($p < 0.001$; $p < 0.01$; $p = 0.057$).

° : different from Caged group ($p < 0.01$).

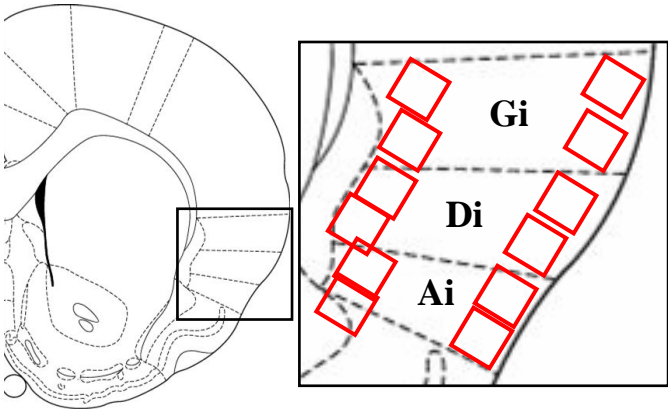
Figure 1

A. Basolateral



- 2.8 mm / Bregma

B. Insular



+ 1.2 mm / Bregma

Figure 2

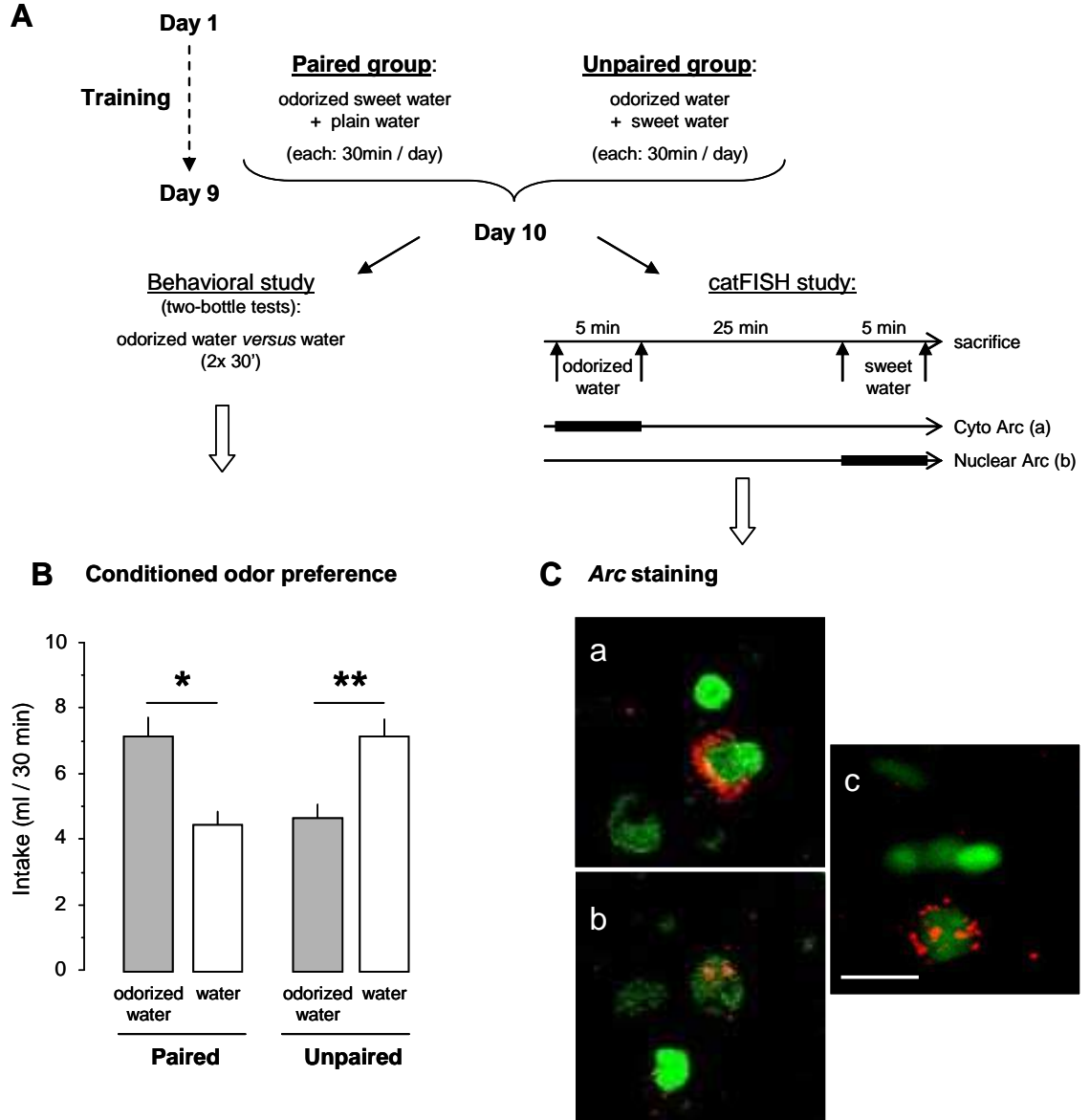
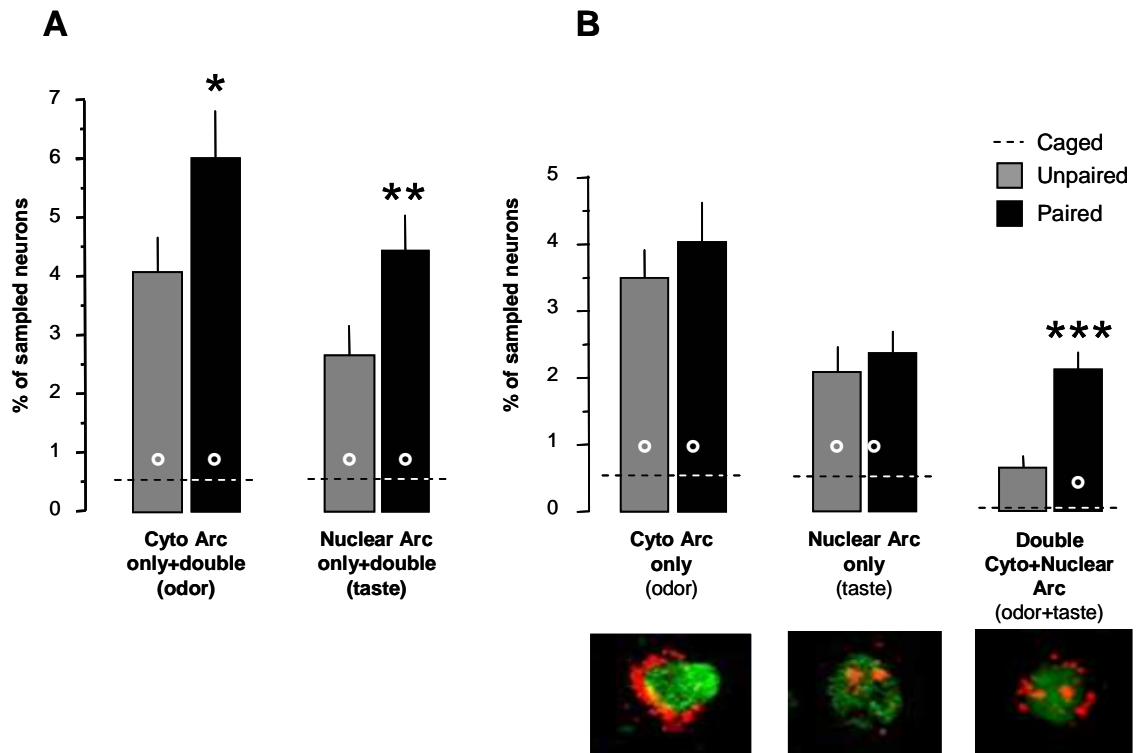
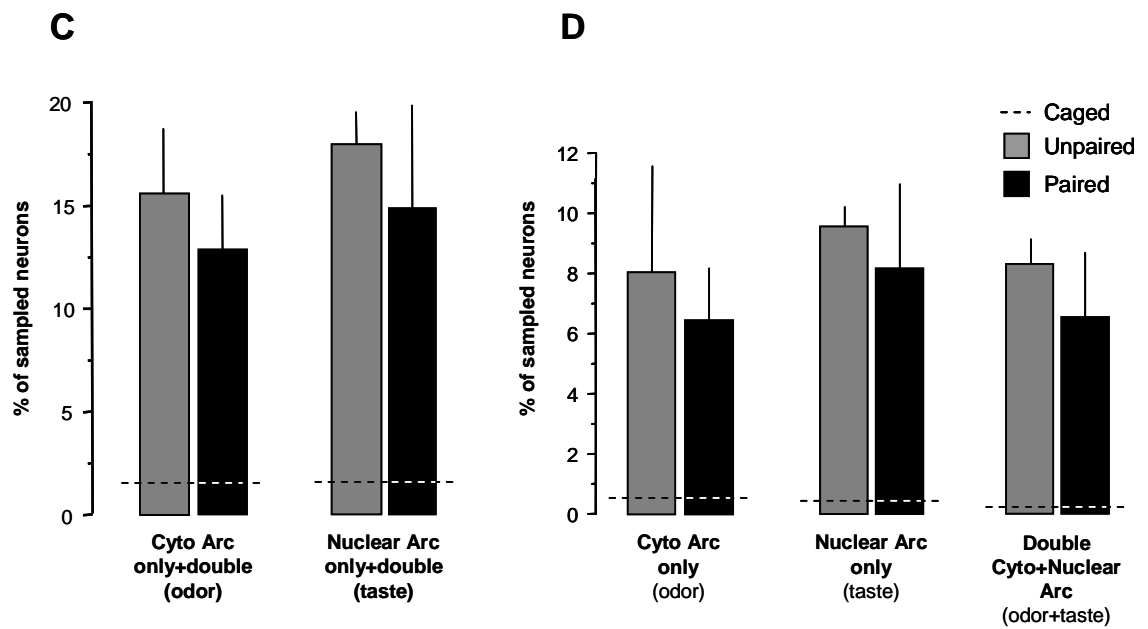


Figure 3

Basolateral amygdala



Insular cortex



DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Durant les 3 chapitres que comporte cette thèse nous nous sommes efforcés de répondre aux questions concernant l'implication différentielle du CI et du NBL dans les apprentissages olfactifs alimentaires. Les principaux résultats sont résumés dans le Tableau 7.

La première question portait sur **le rôle du CI dans les apprentissages olfactifs alimentaires**. Les données de la littérature indiquaient que la lésion du CI n'engendre aucune perturbation sur ces apprentissages. Cette absence d'effet pourrait être due à un phénomène de compensation par d'autres structures. L'approche pharmacologique que nous avons employée dans le modèle d'AOC a permis d'infirmer cette hypothèse. En effet, l'inactivation transitoire ou le blocage de la synthèse protéique destinées à bloquer l'action potentielle du CI, respectivement lors de l'acquisition et de la consolidation de l'AOC, n'ont conduit à aucune perturbation de cet apprentissage. Qui plus est, l'inactivation du CI avant le rappel récent ou ancien n'a pas eu plus d'effet sur cette AOC. Cette absence d'effet ne peut être expliquée par notre méthodologie puisque nous avons mis en évidence avec la même approche l'importance du CI dans l'acquisition, la consolidation et le rappel d'un autre type d'apprentissage aversif alimentaire, l'AGC. Ces résultats indiquent donc que même de façon transitoire, le CI n'est indispensable à aucun des processus mnésiques de l'AOC.

Le deuxième volet de la thèse concernait le rôle joué par le NBL dans les différentes étapes de ces apprentissages. Là encore par une approche pharmacologique nous avons cherché à caractériser **l'implication du NBL dans l'acquisition, la consolidation et le rappel récent et ancien de l'AOC**. En inactivant transitoirement le NBL avant mais pas après la présentation de l'odeur, nous avons réussi à bloquer l'acquisition de l'AOC. Cet effet serait dû à une perturbation de l'encodage de l'odeur plutôt qu'à son association avec le malaise comme le suggèrent les déficits obtenus avec le paradigme d'inhibition latente. De plus, l'inactivation du NBL avant les rappels récent et ancien perturbent dans les deux cas l'expression de l'AOC. De ce fait, en plus d'être primordial pour l'acquisition

AOC	Amygdale basolatérale	Cortex insulaire	
Acquisition	++	-	++
Consolidation	++	-	++
Rappel récent	++	-	++
Rappel ancien	++	-	++
POC	Amygdale basolatérale	Cortex insulaire	
↗ Convergence SC-SI	++	-	


 : résultats obtenus sur l'AGC

Tableau 7. Résumé des principaux résultats de la thèse. En rouge : résultats nouveaux ; en noir : résultats de la littérature confirmés.

des apprentissages olfactifs alimentaires, le NBL apparaît aussi impliqué de façon permanente dans le rappel de l'AOC. Il restait à vérifier si le NBL était important pour la consolidation de ces apprentissages et nous avons répondu à cette question en procédant à un blocage de la synthèse protéique par l'anisomycine au sein du NBL. Infusée avant la présentation de l'odeur, l'anisomycine entraîne une perturbation mineure de la MCT mais qui se révèle drastique pour la MLT, témoignant du rôle important de la synthèse protéique au sein du NBL dans la consolidation de l'AOC. De plus, cette inhibition induite à différents moments de l'apprentissage nous a permis de caractériser une fenêtre temporelle où cette synthèse protéique est nécessaire.

Le troisième et dernier volet de la thèse visait à évaluer dans quelle mesure **l'implication du NBL dans les apprentissages olfactifs alimentaires s'accompagne d'une modification de la population neuronale codant l'association SC-SI**. De plus, au regard de la littérature et de nos résultats sur le CI, nous faisons la prédiction que cette plasticité neuronale ne se rencontrerait pas dans cette structure corticale. Nous avons pour cela utilisé la technique du catFISH, permettant de visualiser l'expression du gène Arc dans différents compartiments cellulaires, que nous avons adaptée à un modèle de POC, résultant de l'association répétée d'une odeur avec du sucre. Nous avons ainsi pu identifier un nombre plus important de neurones répondant aux deux stimulations odeur et goût (présentant donc un double marquage Arc) suite à l'apprentissage de la POC par rapport à des animaux pseudo-conditionnés au sein du NBL mais pas du CI (les résultats du CI restant à confirmer sur un plus grand nombre d'animaux). Ainsi cette augmentation de la population de neurones répondant aux deux stimulations suite à l'apprentissage traduit une convergence des informations olfacto-gustatives au sein du NBL qui pourrait être un des mécanismes à la base de la POC et des apprentissages olfactifs alimentaires en général.

La discussion suivante s'ouvre sur les caractéristiques comportementales de ces apprentissages. Nous discuterons ensuite du rôle respectif du NBL et du CI dans ces apprentissages. Nous élargirons enfin le débat en abordant la question des interactions entre NBL et CI pour finir sur le potentiel réseau de structures traitant les apprentissages olfactifs alimentaires.

1- Les modèles comportementaux AOC et POC

Le choix des odeurs de banane (isoamyl acétate) et d'amande (benzaldéhyde) dans nos expériences, aussi bien dans le cadre de l'AOC que de la POC, n'était pas fortuit. En effet les solutions aqueuses d'isoamyl acétate et de benzaldéhyde ne possèdent pas de propriétés gustatives, ou du moins ne sont pas perçues par rapport à leurs caractéristiques gustatives (Slotnick et al., 1997 ; Rusiniak et al., 1979). Slotnick montre que des rats anosmiques (bulbectomisés) sont incapables de faire la différence entre de l'eau odorisée à la banane (0.1% et 0.01% d'isoamyl acétate) et de l'eau normale alors qu'ils différencient l'eau sucrée de l'eau normale comme les rats témoins (Slotnick et al., 1997). De façon similaire, les rats anosmiques de Rusiniak ne sont pas plus capables de détecter l'eau odorisée à l'amande (2%) de l'eau normale mais se révèlent aussi performants que les animaux contrôles dans la détection du goût (Rusiniak et al., 1979). Ces résultats soulignent le caractère essentiellement olfactif des solutions odorisées que nous avons utilisées, d'autant plus que dans nos conditions, les concentrations étaient beaucoup moins importantes (0.01% pour l'isoamyl acétate et le benzaldéhyde). Qui plus est, nos études pharmacologiques corroborent ces résultats. L'inactivation du CI perturbe l'apprentissage de l'aversion gustative mais n'a aucun effet sur l'apprentissage de l'aversion à l'isoamyl acétate ou au benzaldéhyde.

Dans cette thèse nous avons utilisé pour l'AOC et la POC des odeurs ingérées. En effet, le mode de présentation des odeurs est déterminant. Longtemps il est apparu que l'odeur n'était pas un SC critique pour apprendre une aversion. Cette idée erronée provenait du fait que la quasi-totalité des études étaient basées sur une présentation uniquement distale de l'odeur, souvent par le biais d'une source olfactive proche de la pipette de boisson (Palmerino et al., 1980 ; Garcia, 1985 ; Ferry et al., 1996). Les travaux récents de Slotnick puis Chapuis ont montré qu'en changeant le mode de présentation de l'odeur, non plus proche de l'eau (condition distale) mais mélangée à celle-ci et donc ingérée (condition distale/proximale), il était possible d'induire une AOC de la même manière qu'une AGC (Slotnick et al., 1997 ; Chapuis et al., 2007). Comme nous l'avons vu dans la première partie, l'ingestion de l'odeur permet ainsi d'établir une AOC avec une seule association odeur/malaise, un IIS pouvant aller jusqu'à deux heures et une rétention de plus d'un mois (voir aussi

Chapuis et al., 2007). L'importance du mode de présentation de l'odeur a été également abordée dans la POC. Là encore, l'apprentissage de la POC est facilement induit avec des odeurs ingérées mais pas avec des odeurs distales (Lucas et Sclafani, 1995). Ces résultats mettent donc l'accent sur la nécessité de l'ingestion de l'odeur au moment du conditionnement et/ou du rappel. Des résultats obtenus dans l'AOC indiquent cependant qu'au moment du test, la condition distale ou ingérée importe peu, les animaux conditionnés avec une odeur ingérée présentant la même aversion pour cette odeur qu'elle soit présentée dans l'eau ou en distale lors du test (Chapuis et al., 2007). Ceci permettrait d'éviter un aliment sans le consommer. En conclusion, l'ingestion de l'odeur est nécessaire au moment du conditionnement et l'odeur distale suffisante pour le rappel de l'AOC. En ce qui concerne la POC, il reste à vérifier que l'odeur distale suffit à son rappel mais compte tenu de l'importance de l'ingestion lors du conditionnement, il est vraisemblable que cette dichotomie se retrouve dans la POC.

Ces résultats posent la question des mécanismes spécifiques de chacun des deux modes de présentation. Les différentes expériences menées chez l'homme apportent des éléments pour comprendre ces différences. D'après Rozin, les odeurs distales et proximales activent deux voies olfactives distinctes, respectivement la voie orthonasale (nez) et la voie rétronasale (bouche), qui pourraient représenter deux expériences sensorielles différentes, l'une externe, l'autre interne (Rozin, 1982). Les sujets testés perçoivent par exemple plus intensément une odeur via la voie orthonasale que la voie rétronasale et sont capables de situer l'origine des différentes odeurs, nez ou bouche (Small et al., 2005). De plus au niveau neurophysiologique, il apparaît que les deux types d'odeur stimulent l'épithélium olfactif différemment (sens et nature du flux olfactif) et donc induisent des activations neuronales différentes (Scott et al., 2007 ; Small et al., 2005 ; Shepherd, 2006).

Cependant, si l'odeur distale n'active que la voie orthonasale, l'odeur ingérée engendre une stimulation rétronasale mais également orthonasale. Comme Pierce et Halpern (1996) l'ont suggéré, plus qu'une dualité qui impliquerait deux voies olfactives indépendantes, il s'agirait d'une complémentarité entre elles lors de l'ingestion. La nécessité de l'ingestion pour l'acquisition de l'AOC, suggère une potentialisation de l'odeur distale (stimulation externe) par une odeur proximale (stimulation interne). Ce possible mécanisme est à rapprocher de celui à l'origine de

l'AOPG dans lequel la stimulation olfactive, externe, est potentialisée par la stimulation gustative, interne (pour revue, voir Batsell & Blankenship, 2002).

Jusqu'ici nous avons abordé le problème chez l'adulte. Mais ces apprentissages olfactifs alimentaires sont-ils induits de la même manière chez le jeune ou même in utero ? Aversions et préférences alimentaires conditionnées ont été mises en évidence aussi bien chez le rat nouveau né que chez le fœtus. Ainsi des fœtus de rat en fin de gestation sont capables d'acquérir des aversions et préférences alimentaires pour un composé olfacto-gustatif (Gruest et al., 2004 ; Smotherman, 1982). Cette capacité d'apprentissage se poursuit après la naissance pendant le développement durant lequel les ratons sont capables de développer des aversions (Languille et al., 2008) et préférences (Cheslock et al., 2000 ; Myers et Sclafani, 2006). Le développement des aversions et préférences alimentaires dès le plus jeune âge peut s'expliquer par le fait que les jeunes doivent rapidement être capables d'apprendre à différencier les aliments sains de ceux nocifs et malgré leur aspect nouveau et leur abondance (Alberts, 1994). Mais si ces expériences montrent bien que, dès la fin de la gestation, les ratons sont capables d'apprentissages alimentaires, compte-tenu de l'utilisation de composés olfacto-gustatifs, elles ne spécifient pas l'importance relative de l'odeur dans ces apprentissages. Des études utilisant des odeurs distales apportent des indices intéressants. Il est ainsi possible d'induire des préférences et aversions chez des ratons âgés de quelques jours, pour une odeur diffusée dans la cage de conditionnement associée soit à des renforcements positifs (caresses, ingestion de lait) ou à un malaise gastrique (Moriceau & Sullivan, 2005 ; Shionoya et al., 2006). Il reste maintenant à démontrer si les ratons sont capables de développer des AOC et des POC basées sur une odeur alimentaire, c'est-à-dire ingérée.

Un dernier point concernant ces apprentissages olfactifs alimentaires mérite d'être discuté. Alors que dans nos conditions, les animaux apprennent l'AOC après une seule association odeur-malaise, Chapuis et collaborateurs (2007) n'obtiennent cette aversion qu'après deux associations (une association n'induit aucune aversion). Ces études diffèrent par les dispositifs expérimentaux utilisés et l'environnement social des animaux : isolés dans nos expériences mais groupés dans celles de Chapuis. Pour évaluer spécifiquement cette influence sociale, des animaux groupés et isolés ont été conditionnés dans le même dispositif

expérimental. Il apparaît qu'une association odeur-malaise engendre une forte AOC chez les rats isolés mais aucune aversion chez les rats groupés (Julie Chapuis et Nadine Ravel, observations non publiées). Par ailleurs, dans les mêmes conditions expérimentales, l'AGC nécessite une seule association goût-malaise chez des animaux isolés ou groupés, indiquant une modulation sociale spécifique de la sensorialité olfactive. Ces données suggèrent que les interactions sociales suite au conditionnement olfactif perturbent l'AOC. Le phénomène de transmission sociale d'une préférence alimentaire (TSPA) pourrait être à l'origine de cette modulation de l'AOC. Dans la TSPA, un rat (observateur) préfère consommer une nourriture s'il a senti l'odeur de cette nourriture dans l'haleine d'un congénère (démonstrateur), même si ce dernier est malade (Galef et Wigmore, 1983 ; Galef et al., 1990). Si c'est l'observateur qui est rendu malade avant d'interagir avec le démonstrateur, son aversion est atténuée (Galef et al., 1990). Dans les conditions de Chapuis et Ravel, les animaux groupés sont, juste après l'acquisition de l'AOC, remis en présence de leurs congénères, eux aussi conditionnés. Ainsi l'association odeur-LiCl qui devrait normalement induire une AOC, est perturbée par les interactions sociales chez des animaux groupés. Au contraire, les animaux isolés, non sujet à ces interactions et donc à la TSPA, développent une forte AOC.

Il serait intéressant d'évaluer l'influence sociale sur la POC car des travaux récents portant sur des associations olfacto-gustatives suggèrent que la modulation sociale pourrait être différente : des animaux isolés après l'association ne retiennent pas celle-ci contrairement aux animaux groupés (Bailey et Westbrook, 2007).

2- Importance du NBL dans l'AOC et la POC

Nos données expérimentales indiquent que le NBL constitue une structure prépondérante pour les apprentissages olfactifs alimentaires. D'une part l'approche pharmacologique a permis de montrer que le NBL était indispensable à toutes les étapes de l'AOC investiguées, l'acquisition, la consolidation et le rappel. D'autre part, l'approche d'imagerie cellulaire montre que la POC s'accompagne d'une convergence du SC olfactif et du SI au sein du NBL. Ce phénomène de convergence dans le NBL pourrait être l'un des mécanismes majeurs sous-tendant la mise en place des apprentissages olfactifs alimentaires.

Le NBL occupe une place centrale dans les apprentissages olfactifs comme le conditionnement de peur à l'odeur et la TSPA. Cependant son importance dans les différentes étapes de mémorisation varie en fonction du type d'apprentissage olfactif. Il participe à l'acquisition et au rappel du conditionnement de peur à l'odeur (Cousens et al., 2003 ; Walker et al., 2005) mais uniquement à l'acquisition et pas au rappel de la TSPA (Wang et al., 2006). Contrairement à l'AOC et au conditionnement de peur à l'odeur, la TSPA fait intervenir une composante sociale qui pourrait impliquer un réseau différent de structures (pour revue : Petrulis & Eichenbaum, 2003).

Si le NBL est nécessaire à l'acquisition et au rappel de l'AOC, cela ne signifie pas que les mêmes mécanismes et neurotransmetteurs sont impliqués dans les deux étapes. Le NBL reçoit en particulier d'importantes projections noradrénergiques, cholinergiques et glutamatergiques (Amaral et al., 1992 ; Fallon et Ciofi, 1992 ; Parent, 1996) qui pourraient moduler différemment ces étapes. Dans l'AOC, le système noradrénergique du NBL est requis lors de l'acquisition mais pas lors du rappel (Miranda et al., 2007). Le système cholinergique, pourrait également intervenir spécifiquement lors de l'acquisition de l'AOC. En effet le blocage des récepteurs muscariniques du NBL perturbe l'acquisition de la TSPA (Carballo-Marquez et al., 2009) et ce système cholinergique est largement impliqué dans l'acquisition de l'AGC (pour revue : Miranda et al., 2003). Concernant le système glutamatergique, des données obtenus sur le conditionnement de peur à l'odeur, l'AOPG et l'AGC indiquent une intervention différentielle des récepteurs NMDA et AMPA du NBL lors de l'acquisition et du rappel : alors que le blocage des récepteurs NMDA et AMPA perturbe l'acquisition, seul le blocage des récepteurs AMPA affectent le rappel (Ferry & Di Scala, 2000 ; Hatfield & Gallagher, 1995 ; Walker et al. 2005 ; Yasoshima et al., 2000). Il serait donc intéressant d'évaluer l'effet du blocage de chacun de ces récepteurs au sein du NBL sur l'acquisition et le rappel de l'AOC

Nous montrons également que la consolidation de l'AOC dépend du NBL. Le blocage de la synthèse protéique au sein du NBL entraîne un déficit important de la MLT, mais pas de la MCT, synonyme de perturbation des processus de consolidation de l'AOC. L'importance du NBL dans la consolidation d'une information olfactive a également été mis en évidence dans un conditionnement de peur (Kilpatrick et Cahill, 2003) mais aussi dans de nombreux apprentissages aversifs n'impliquant pas d'odeur (Schafe and LeDoux, 2000; Milekic et al., 2007). Ces

données laissent donc penser que le NBL possède un rôle déterminant dans le traitement des informations aversives mais aussi dans leur maintien, permettant la consolidation des différents apprentissages olfactifs ou non.

Le fait que le NBL soit l'une des structures clés de la consolidation de l'AOC laisse envisager qu'il pourrait en être de même dans un autre processus : la reconsolidation. Le concept de reconsolidation est basé sur le fait que la réactivation d'une mémoire stable et consolidé induit un état d'instabilité ou de labilité qui nécessite à nouveau une stabilisation de la mémoire (Nader et Hardt, 2009). Comme la consolidation d'une nouvelle mémoire, la reconsolidation d'une mémoire réactivée dépend de la synthèse protéique. Ce phénomène a été mis en évidence dans différents types de mémoire dont l'AGC (Eisenberg et al., 2003 ; Gruet et al., 2004 ; Languille et al., 2008). Le NBL semble être un site privilégié pour la reconsolidation des mémoires aversives (conditionnement de peur : Nader et al., 2000 ; l'évitement passif : Milekic et al., 2007 ; AGC : Koh et Bernstein, 2003 ; mais voir aussi Bahar et al., 2004) et il pourrait en être de même pour l'AOC.

Nos expériences ont permis de mettre en évidence que le blocage de l'activité du NBL perturbe le rappel récent (3 jours) et ancien (un mois) de l'AOC. Deux théories s'affrontent quant au rôle du NBL dans la mémoire aversive. La première théorie qui est à mettre au crédit de Jim McGaugh, décrit l'amygdale comme une structure modulatrice constituant une étape importante vers le stockage des informations aversives dans d'autres structures (McGaugh et al., 2000). Elle est essentiellement basé sur des travaux portant sur l'évitement passif et montrant que le NBL n'est plus nécessaire au rappel passé quelques jours (Izquierdo et al., 1997 ; Liang et al., 1982, 1996). La seconde théorie, celle de Joseph Ledoux, oppose à cette idée un NBL se situant à un niveau d'intégration des informations aversives égal ou plus élevé que les autres structures et constituant un site de stockage à long terme à part entière (Ledoux et al., 2000). Ceci est illustré par le fait que l'expression de la peur conditionnée dépend de façon permanente du NBL (Lee et al., 1996 ; Maren et al., 1996 ; Gale et al., 2004). Nos résultats font d'ores et déjà pencher la balance du côté de la théorie de Joseph Ledoux, puisque l'importance du NBL dans le rappel d'AOC ancienne suggère que cette structure constitue un site de stockage permanent de l'information olfactive. Des études récentes ont mis en évidence que la phosphorylation continue d'une protéine, la protéine kinase Mzeta (PKM ζ) est un

mécanisme fondamental participant au stockage de la mémoire (Pastalkova et al., 2006 ; Shema et al., 2007). L'inhibition de la PKM ζ dans différentes structures perturbe de façon permanente différents types de mémoires déjà consolidées. En particulier, l'inhibition de cette protéine dans le NBL bloque le conditionnement de peur et l'évitement passif (Serrano et al., 2008). Un tel mécanisme pourrait également être à l'origine de la persistance à long-terme de l'AOC, mais également de la POC.

Les effets du blocage de l'activité du NBL sont plus marqués sur le rappel ancien que sur le rappel récent de l'AOC. Cette différence peut s'expliquer de deux manières. Intuitivement on peut supposer qu'un mois après l'acquisition la mémoire est moins forte et donc plus sensible aux manipulations du NBL dont elle dépend. Toutefois les animaux témoins présentent une AOC similaire voire même plus forte lors d'un rappel ancien comparé à un rappel récent (voir aussi Chapuis et al., 2007). La seconde possibilité, plus vraisemblable, est qu'avec le temps il s'opère une réorganisation des bases neurobiologiques qui sous-tendent le rappel de l'AOC, celui-ci devenant plus dépendant du NBL. En effet, l'importance de certaines structures cérébrales évolue avec le temps dans certains types de mémoires spatiales et contextuelles mais aussi dans l'AGC (pour revue voir Frankland et Bontempi, 2005 ; Wiltgen et al., 2006 ; Ding et al., 2008).

Nous avons jusqu'ici beaucoup discuté de l'implication du NBL dans les différentes étapes des apprentissages olfactifs alimentaires. La dernière partie de la thèse a été consacrée à la recherche des mécanismes cellulaires à la base de ces associations. Plusieurs études d'électrophysiologie et d'imagerie réalisées sur des apprentissages associatifs ont mis en évidence que le NBL était un site de plasticité induite par la convergence du SC et du SI (Blair et al., 2001 ; Barot et al., 2008). En particulier, après ces apprentissages, le nombre et/ou l'activité des neurones répondant au SC est augmentée (Blair et al., 2003 ; Dardou et al., 2006 ; Ferreira et al., 2005 ; Han et al., 2007 ; Romanski et al., 1993 ; Reijmers et al., 2007). Cette augmentation serait due au recrutement de la population répondant au SI (Blair et al., 2003) sans que ce soit clairement démontré. Nous avons donc testé l'hypothèse selon laquelle l'apprentissage de la POC induirait une augmentation de la population répondant au SC (odeur) dans le NBL par le recrutement d'une partie de la population répondant au SI (goût sucré).

L'utilisation de la technique du catFISH, reposant sur l'expression nucléaire ou cytoplasmique du gène Arc, nous a permis d'apporter quelques éléments de réponse. L'apprentissage de la POC induit un nombre plus important de neurones répondant à l'odeur par rapport à des animaux pseudo-conditionnés et cette augmentation est due spécifiquement à l'augmentation de la population neuronale répondant aux deux stimulations odeur et goût (c'est-à-dire présentant un double marquage). Si cette augmentation de la population de neurones doublement activés traduit une convergence des informations olfacto-gustatives au sein du NBL, le mécanisme à l'origine de cette convergence apparaît plus complexe que nous ne l'avions pensé.

Deux scénarii sont possibles. Le premier, basé sur le postulat de Hebb, voudrait que la POC (association odeur-goût) renforce la connexion entre certains neurones activés par l'odeur et d'autres activés par le goût. Suite à l'apprentissage, la représentation de l'odeur ou du goût devrait activer tous les neurones dont les connexions ont été renforcées et ainsi augmenter le nombre de neurones répondant aux deux stimulations. En contre partie cette augmentation devrait s'accompagner d'une diminution des populations qui ne répondent qu'à une seule des deux stimulations (Figure 11.1). Si nous avons bien observé une augmentation de la population répondant aux deux stimulations, aucune diminution des autres populations n'est apparue.

Une autre explication, plus plausible, résiderait dans le recrutement d'une nouvelle population de neurones répondant aux deux stimulations après l'apprentissage de la POC. Dans ce cas de figure, il faut prendre en compte une population de neurones qui répond initialement de manière faible ou infraliminaire à chaque stimulation (odeur et goût) et n'est donc activée ni par l'odeur ni par le goût. La présentation simultanée de l'odeur et du goût conduit à une sommation des stimulations qui active alors plus fortement cette population que la présentation séparée. L'apprentissage de la POC, avec la présentation répétée du mélange odeur-goût, permet donc à chaque stimulation, indépendamment, de devenir suffisante pour activer les neurones de cette nouvelle population. Ce scénario prédit que les populations de neurones répondant exclusivement à une seule stimulation ne doivent pas changer, mais que la population de neurones répondant aux deux doit augmenter grâce au recrutement de nouveaux neurones (Figure 11.2). En effet, c'est exactement ce que nous avons observé dans nos expériences.

Il est à noter qu'une étude très récente utilisant le catFISH a mis en évidence une augmentation de la convergence SC-SI au sein du NBL lors de l'acquisition de l'AGC (Barot et al., 2008). Ces résultats et ceux de notre étude laissent supposer qu'au sein du NBL des mécanismes similaires de convergence s'opèrent lors de l'AOC.

En mettant en perspective les résultats obtenus avec le catFISH lors de la POC et de l'AGC, et ceux obtenus avec l'approche électrophysiologique lors de la peur conditionnée au son (Blair et al., 2001), le NBL apparaît alors comme un site privilégié de convergence de différents SC et SI. Ainsi, sur la base des modèles hebbiens de plasticité selon lesquels la connexion entre deux neurones augmente s'ils sont activés simultanément (Hebb, 1949), la convergence SC-SI au sein du NBL pourrait être l'un des mécanismes sous-jacents aux apprentissages associatifs en général.

3- Implication et rôle du CI dans l'AOC et la POC

Bien que des afférences olfactives aient été mises en évidence dans le CI, les études lésionnelles n'ont jamais souligné un rôle du CI dans l'AOC (Kiefer et al., 1982, 1984 ; Roman et al., 2006). Cependant les lésions permanentes peuvent entraîner une réorganisation du réseau des structures intervenant dans l'AOC qui pourrait pallier l'absence du CI. L'approche pharmacologique s'imposait donc pour caractériser cette implication éventuelle du CI dans les différentes étapes de l'AOC. Nos résultats ne montrent aucun effet des différents traitements pharmacologiques destinés à bloquer le CI avant l'acquisition, la consolidation, le rappel récent ou le rappel ancien de l'AOC. Cela suggère que le CI n'est en aucune manière indispensable à l'apprentissage de l'AOC. Parallèlement, des études récentes montrent que la lésion du CI n'a pas d'effet sur la POC (Sakai et Yamamoto, 2001 ; Touzani et Sclafani, 2007). Grâce à la technique du catFISH, nous révélons au niveau cellulaire dans le CI, contrairement au NBL, une absence d'augmentation de convergence SC-SI suite à l'apprentissage de la POC (ces résultats sont toutefois à confirmer sur un plus grand nombre d'animaux). L'ensemble de ces données indique donc que le CI n'est pas une structure critique pour les aversions et préférences olfactives conditionnées.

Les résultats de cette approche interventionnelle contrastent avec une partie de la littérature basée sur une approche corrélationnelle. Des travaux récents d'électrophysiologie indiquent ainsi que le CI est activé lors du rappel de l'AOC (Chapuis et al., soumis). De même, la présentation de l'odeur suite à l'apprentissage de l'AOPG engendre une augmentation de l'expression des protéines Fos et Egr1 au sein du CI (Dardou et al., 2006 ; 2007). D'autres structures comme le NBL, les corti piriforme, frontal médian et orbitofrontal sont également activées lors de la présentation de l'odeur aversive. En mettant en relation tous ces résultats nos constatons que le CI est activé par l'odeur suite à un apprentissage olfactif, bien que cela ne signifie pas qu'il soit impliqué.

Alors que l'inactivation du CI n'a pas d'effet sur l'AOC, elle perturbe un autre apprentissage olfactif, la TSPA (Fortis-Santiago et al., 2008). Cependant, la TSPA est basée sur des odeurs orthonasales alors que l'AOC repose également sur des odeurs rétronasales. Ces apprentissages impliquent des mécanismes différents (association odeur-odeur pour la TSPA et odeur-malaise pour l'AOC) et comprennent une dimension sociale déterminante pour la TSPA (Galef et Wigmore, 1983). Ces différences expliqueraient que ces tâches ne reposent pas sur le même réseau de structures, impliquant différenciellement le CI (pour revue : Petruilis & Eichenbaum, 2003).

Concernant la POC, des animaux peuvent développer une préférence pour une flaveur associée à la stimulation électrique du CI (Cubero et Puerto, 2000). Les auteurs suggèrent que cette stimulation servirait de SI en mimant les effets positifs d'un nutriment. Néanmoins, cela ne signifie pas que l'intégrité du CI soit nécessaire à la POC en condition normale (non-stimulée). La stimulation électrique du CI pourrait activer d'autres structures normalement impliquées dans le traitement du SI comme le NBL et le NPB (voir Touzani et Sclafani, 2007).

Enfin, en réalisant des expériences sur les effets de l'interaction entre AGC et AOC, nous avons obtenu des données préliminaires qui indiquent que l'inactivation du CI perturbe l'AOC lorsque les animaux ont préalablement appris une AGC. Cet effet est spécifique de l'association goût-malaise puisqu'il ne se vérifie pas si l'AOC succède à une première AOC ou si les animaux ont expérimenté un goût seul (non associé au malaise). Ceci suggère que l'association goût-malaise engendre une plasticité particulière au sein du CI qui intégrerait cette structure au sein du réseau nécessaire à l'AOC.

Même si le CI est une structure recevant des informations olfactives, gustatives et viscérales, les différentes approches utilisées ici chez des animaux naïfs n'ont pas permis de révéler la nécessité du CI dans les apprentissages olfactifs alimentaires. Il reste à chercher si cette plasticité du CI est spécifiquement induite par l'AGC ou d'autres apprentissages, et si elle ne concerne que l'AOC ou les apprentissages olfactifs en général.

4- Interactions entre NBL et CI dans les apprentissages olfacto-gustatifs alimentaires

Nos travaux soulignent que les apprentissages olfactifs et gustatifs alimentaires impliqueraient différemment le NBL et le CI. Nous montrons au cours de cette thèse que les apprentissages olfactifs, AOC et POC, sollicitent le NBL mais pas le CI. Ces résultats corroborent les données lésionnelles obtenus sur l'AOC (Bermudez et al., 1983 ; 1986 ; Kiefer et al., 1982, 1984 ; Roman et al., 2006) et la POC (Gilbert et al., 2003 ; Sakai et Yamamoto, 2001 ; Touzani et Sclafani, 2005, 2007). Ils sont également à rapprocher des données obtenues sur l'AOPG où l'aversion olfactive est fortement altérée par la lésion ou l'inactivation du NBL mais peu par celle du CI (Bermudez et al., 1983, 1986 ; Fernandez-Ruiz et al., 1993 ; Ferry et al., 1995 ; Ferry et Di Scala, 2000 ; Hatfield et al., 1992 ; Hatfield et Gallagher, 1995 ; Inui et al., 2006 ; Kiefer et al., 1982, 1984 ; Lasiter et al., 1985).

Contrairement à l'AOC et la POC, l'importance relative du NBL et du CI semble inversée dans les apprentissages gustatifs. Comme nous l'avons vu dans la première partie de la thèse le CI est indispensable aux différentes étapes de formation et de rappel de l'AGC. Si l'implication du NBL dans l'AGC reste controversé (cf. Introduction Tableau 3 ; pour revues : Lamprecht et Dudai, 2000 ; Reilly et Bornovalova, 2005), elle semble en tout cas moins importante pour l'AGC que l'AOC. Le blocage du système noradrénergique n'affecte pas l'acquisition de l'AGC (Miranda et al., 2008) alors qu'il perturbe l'acquisition de l'AOC (Miranda et al., 2007). De même, l'inhibition de la synthèse protéique au sein du NBL n'a aucun effet sur l'AGC (Bahar et al., 2003) alors que nous avons mis en évidence qu'elle perturbe la consolidation de l'AOC. L'implication différentielle du CI et du NBL dans l'AGC est également supportée par les données concernant l'AOPG. Celles-ci montrent que la

lésion du CI mais pas du NBL perturbe de façon importante l'aversion au goût (Bermudez et al., 1983, 1986 ; Fernandez-Ruiz et al., 1993 ; Ferry et al., 1995 ; Ferry et Di Scala, 2000 ; Hatfield et al., 1992 ; Hatfield et Gallagher, 1995 ; Inui et al., 2006 ; Kiefer et al., 1982, 1984 ; Lasiter et al., 1985). Enfin, des lésions de l'amygdale, englobant NBL et NC, ne perturbent pas les préférences gustatives conditionnées (alors qu'elle affecte largement la POC ; Touzani et Sclafani, 2005).

L'ensemble de ces résultats suggèrent une double dissociation : (1) un rôle essentiel du NBL mais pas du CI dans les apprentissages olfactifs alimentaires et (2) un rôle prépondérant du CI par rapport au NBL dans les apprentissages gustatifs. Néanmoins le NBL et le CI sont liés par d'importantes connexions anatomiques (Krettek et Price, 1977 ; Saper, 1982 ; Dunn et Everitt, 1988 ; Shi et Cassell, 1998) et fonctionnelles (Escobar et al., 1998, 2002 ; Ferreira et al., 2005 ; Jones et al., 1999 ; Kodama et al., 2001 ; Miranda et McGaugh, 2004 ; Yamamoto et al., 1984). Dans les conditions naturelles l'aliment est caractérisé par l'ensemble de ses composantes chimiosensorielles, olfactive et gustative. Si le NBL et le CI traitent préférentiellement l'une ou l'autre de ces composantes, les interactions NBL-CI pourraient permettre leur intégration et leur mémorisation sous la forme d'une flaveur.

5- Importance d'autres structures dans les apprentissages olfactifs alimentaires

Jusqu'ici nous avons focalisé notre attention sur le NBL et le CI. Cependant, ces structures font partie d'un réseau plus étendu qui pourraient aussi intervenir dans les apprentissages olfactifs alimentaires. En effet, une étude récente indique que l'AOC engendre des activations électrophysiologiques spécifiques au sein du bulbe olfactif et des corti piriforme, orbitofrontal et préfrontal médian (Chapuis et al., soumis).

L'importance fonctionnelle du **bulbe olfactif** et du **cortex piriforme** n'a pas été évalué directement dans l'AOC ou la POC. Néanmoins, ces structures ne représenteraient pas un simple relais de l'information olfactive. En particulier, chez le rongeur et l'homme, les apprentissages olfactifs induisent une plasticité spécifique du processus associatif plutôt que de l'exposition à l'odeur dans le bulbe olfactif (Pager et Royet, 1976 ; pour revue : Mandairon & Linster, 2009) et le cortex piriforme (Dardou et al., 2007 ; Gottfried et al., 2002 ; Jones et al., 2007 ; Li et al., 2008 ;

Sevelinges et al., 2004). Il serait donc intéressant d'évaluer leur importance fonctionnelle dans la formation et le rappel de l'AOC et de la POC.

Les structures frontales, **cortex orbitofrontal** et **cortex préfrontal médian**, sont également activées par différents apprentissages olfactifs comme l'AOPG, la TSPA ou un apprentissage associatif odeur-récompense (Dardou et al., 2006, 2007 ; Smith et al., 2007 ; Tronel et al., 2002). Au niveau fonctionnel, la lésion des afférences cholinergiques du cortex orbitofrontal perturbe la TSPA (Ross et al., 2005). Cependant, nous n'avons mis en évidence aucun effet de l'inactivation du cortex orbitofrontal sur l'acquisition et le rappel de l'AOC (voir annexe 1). Il reste toutefois à évaluer les effets de l'inactivation du cortex préfrontal médian sur l'AOC. Celui-ci est indispensable à l'acquisition et la consolidation de la TSPA (Boix-Trelis et al., 2007 ; Carballo-Marquez et al., 2009) mais également d'un apprentissage associatif odeur-récompense (Carballo-Marquez et al., 2007 ; Tronel et Sara, 2003 ; Tronel et al., 2004). Ce cortex pourrait donc revêtir une importance particulière dans les apprentissages olfactifs associatifs, odeur récompense ou odeur-malaise.

Parmi les structures concernées par le traitement de l'olfaction et le stockage de la mémoire associée, le rôle de la **formation hippocampique** reste à préciser dans les apprentissages olfactifs alimentaires. La lésion excitotoxique du cortex entorhinal facilite l'AOC (Ferry et al., 2006). Ces résultats sont à rapprocher de l'inactivation de l'hippocampe qui facilite l'AGC (Stone et al., 2005), suggérant un rôle inhibiteur de la formation hippocampique sur des conditionnements élémentaires comme l'AOC et l'AGC. Toutefois des travaux indiquent que la lésion électrolytique de l'hippocampe perturbe l'AOC (Miller et al., 1986). Compte tenu de la lésion des fibres de passages et des importants effets secondaires induits par les lésions électrolytiques, il nous paraît indispensable de réévaluer le rôle de l'hippocampe dans l'AOC, mais également la POC.

6- Conclusions et perspectives

Nous avons cherché au cours de la thèse à améliorer les connaissances relatives aux apprentissages olfactifs alimentaires, en particulier à préciser le rôle joué par deux structures cérébrales recevant des informations olfactives mais également gustatives et viscérales : le NBL et le CI.

Nous montrons d'une part que le NBL est nécessaire à la formation et au rappel de l'AOC, représentant un site potentiel de stockage de cette association ; d'autre part que l'apprentissage de la POC s'accompagne d'une augmentation de la convergence des informations olfactives et gustatives au sein des neurones du NBL. Ces résultats font apparaître le NBL comme l'une des structures incontournables dans les apprentissages olfactifs alimentaires au contraire du CI. Néanmoins nous confirmons que c'est une structure clé dans la formation et le rappel de l'AGC, représentant là aussi un site potentiel de stockage permanent de ces apprentissages gustatifs.

Plusieurs perspectives se dégagent de cette thèse. D'abord au niveau comportemental, il sera intéressant d'une part d'approfondir l'importance de la voie olfactive rétronasale dans l'établissement de l'AOC et de la POC et d'autre part d'éclaircir le rôle de l'influence sociale dans la mise en place de ces apprentissages olfactifs.

Au niveau neurobiologique, il semble judicieux à court terme d'évaluer l'importance de différents neurotransmetteurs libérés au sein du NBL (glutamate, acétylcholine ...) dans la formation et le rappel de l'AOC et de la POC. Il serait également primordial d'évaluer l'effet de l'inhibition de la protéine kinase Mzéta dans le NBL sur la persistance de la mémoire de l'AOC et de la POC. Si ce traitement est en effet amnésiant, l'étape suivante consistera à combiner cette approche pharmacologique avec l'imagerie cellulaire catFISH afin de voir si la perturbation mnésique s'accompagne d'une diminution de la convergence SC-SI au sein du NBL.

Comme nous l'avons observé de façon préliminaire, le CI pourrait devenir nécessaire aux apprentissages olfactifs après une expérience mnésique sollicitant de façon importante le CI (l'AGC). Si ces résultats se confirment il serait alors intéressant de caractériser les phénomènes de plasticité à l'origine de cette réorganisation des systèmes à la base de cette mémoire olfactive.

Enfin, l'élargissement du réseau à d'autres structures est indispensable. Les approches de pharmacologie, d'imagerie cellulaire mais également d'électrophysiologie devraient permettre dans un premier temps de caractériser l'implication réelle des différents corti (piriforme et frontaux) et de l'hippocampe dans l'AOC et la POC. Ensuite l'utilisation d'approches combinées pourra se révéler particulièrement pertinente et permettre d'aller plus loin dans les interactions entre structures au sein du réseau. Nous pourrions par exemple évaluer l'effet de

l'inactivation d'une structure sur l'activité des autres structures du réseau lors de la formation ou du rappel de l'AOC ou de la POC.

En spécifiant les rôles respectifs du NBL et du CI dans les apprentissages olfactifs alimentaires, nous avons contribué, aussi mineure soit cette contribution, à faire avancer la compréhension des bases neurobiologiques de la mémoire alimentaire. Mais répondre à certaines questions en appelle inévitablement de nouvelles, et il reste encore quantité de choses à découvrir à propos des phénomènes infiniment complexes de la mémoire.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

-A-

- Abrams TW, Kandel ER (1988) Is contiguity detection in classical conditioning a system or a cellular property? Learning in *Aplysia* suggests a possible molecular site. *Trends Neurosciences* 11:128-135.
- Alberini CM (2008) The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiology of Learning & Memory* 89:234-246.
- Alberts JR (1994) Learning as adaptation of the infant. *Acta Paediatrica Supplement* 397:77-85.
- Amaral DG, Price JL, Ptkanen A, Carmichael ST (1992) Anatomical organization of the primate amygdaloid complex. In *The Amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction* (JP Aggleton Eds.) pp. 1-66. Wiley-Lyss, New York.
- Atkinson R, Shiffrin R (1968) Human memory: A proposed system and its control processes in *The Psychology of Learning and Motivation: Advances in Research and Theory*, Vol. 2, pp. 89-195, New York, Academic Press.

-B-

- Baddeley AD, Hitch G (1974) *Working memory*. In *The psychology of learning and motivation: Advances in research and theory* (G.H. Bower Eds.), Vol. 8, pp. 47-89). New York: Academic Press.
- Bahar A, Samuel A, Hazvi S, Dudai Y (2003) The amygdalar circuit that acquires taste aversion memory differs from the circuit that extinguishes it. *European Journal of Neuroscience* 17:1527-1530.
- Bahar A, Dorfman N, Dudai Y (2004) Amygdalar circuits required for either consolidation or extinction of taste aversion memory are not required for reconsolidation. *European Journal of Neuroscience* 19:1115-1118.
- Bailey GK, Westbrook RF (2007) Within-event learning is disrupted by social isolation immediately after compound exposure. *Behavioural Brain Research* 178:313-316.

- Barot SK, Kyono Y, Clark EW, Bernstein IL (2008) Visualizing stimulus convergence in amygdala neurons during associative learning. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 105:20959-20963.
- Batsell WR, Jr., Blankenship AG (2002) Beyond potentiation: synergistic conditioning in flavor-aversion learning. *Brain and mind* 3:383-408.
- Berenbaum, MR, Miliczy E (1983) Mantids and milkweed bugs: Efficacy of aposematic coloration against invertebrate predators. *American Midland Naturalist* 111:64-8.
- Bergson H (1896) *Matière et Mémoire* ; essai sur la relation du corps à l'esprit. Paris : PUF, 1997.
- Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y (2000) The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *Journal of Neuroscience* 20:7017-7023.
- Bermudez-Rattoni F, Rusiniak KW, Garcia J (1983) Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste is disrupted by application of novocaine into amygdala. *Behavioral Neural Biology* 37:61-75.
- Bermudez-Rattoni F, Grijalva CV, Kiefer SW, Garcia J (1986) Flavor-illness aversions: the role of the amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiology & Behavior* 38:503-508.
- Bermudez-Rattoni F, Coburn KL, Fernandez J, Chavez AF, Garcia J (1987) Potentiation of odor by taste and odor aversions in rats are regulated by cholinergic activity of dorsal hippocampus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 26:553-559.
- Bermudez-Rattoni F, McGaugh JL (1991) Insular cortex and amygdala lesions differentially affect acquisition on inhibitory avoidance and conditioned taste aversion. *Brain Research* 549:165-170.
- Bernstein IL (1999) Taste aversion learning: a contemporary perspective. *Nutrition* 15:229-234.
- Best MR, Domjan M, Haskins WL (1978) Long-term retention of flavor familiarization: effects of number and amount of prior exposures. *Behavioral Biology* 23:95-99.
- Blair HT, Schafe GE, Bauer EP, Rodrigues SM, LeDoux JE (2001) Synaptic plasticity in the lateral amygdala: a cellular hypothesis of fear conditioning. *Learning & Memory* 8:229-242.
- Blair HT, Tinkelman A, Moita MA, LeDoux JE (2003) Associative plasticity in neurons of the lateral amygdala during auditory fear conditioning. *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp. 985:485-7.
- Boehnke SE, Rasmusson DD (2001) Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods* 105:133-141.

- Boix-Trelis N, Vale-Martinez A, Guillazo-Blanch G, Marti-Nicolovius M (2007) Muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat prelimbic cortex impairs the social transmission of food preference. *Neurobiology of Learning & Memory* 87:659-668.
- Brown MS, Grunfeld CC (1980) Taste preferences of infants for sweetened or unsweetened foods. *Research Nursing Health* 3:11-17.
- Bures J, Buresova O (1990) Reversible lesions allow reinterpretation of system level studies of brain mechanisms of behaviour. *Concepts in Neuroscience* 1:69-89.

-C-

- Cain DP, Bindra D (1972) Responses of amygdala single units to odors in the rat. *Experimental Neurology* 35:98-110.
- Capaldi ED, Campbell DH, Sheffer JD, Bradford JP (1987) Conditioned flavor preferences based on delayed caloric consequences. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 13:150-155.
- Capaldi ED, Sheffer JD (1992) Contrast and reinforcement in consumption. *Learning and Motivation* 23:63-79.
- Carballo-Marquez A, Vale-Martinez A, Guillazo-Blanch G, Torras-Garcia M, Boix-Trelis N, Marti-Nicolovius M (2007) Differential effects of muscarinic receptor blockade in prelimbic cortex on acquisition and memory formation of an odor-reward task. *Learning & Memory* 14:616-624.
- Carballo-Marquez A, Vale-Martinez A, Guillazo-Blanch G, Marti-Nicolovius M (2009) Muscarinic transmission in the basolateral amygdala is necessary for the acquisition of socially transmitted food preferences in rats. *Neurobiology of Learning & Memory* 91:98-101.
- Cechetto DF, Saper CB (1987) Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 262:27-45.
- Chapuis J, Messaoudi B, Ferreira G, Ravel N (2007) Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats. *Behavioral Neuroscience* 121:1383-1392.
- Cheslock SJ, Varlinskaya EI, Petrov ES, Spear NE (2000) Rapid and robust olfactory conditioning with milk before suckling experience: promotion of nipple attachment in the newborn rat. *Behavioral Neuroscience* 114:484-495.
- Cinelli AR, Ferreyra-Moyano H, Barragan E (1987) Reciprocal functional connections of the olfactory bulbs and other olfactory related areas with the prefrontal cortex. *Brain Research Bulletin* 19:651-661.

- Cousens GA, Otto T (2003) Neural substrates of olfactory discrimination learning with auditory secondary reinforcement. I. Contributions of the basolateral amygdaloid complex and orbitofrontal cortex. *Integrative Physiological and Behavioural Science* 38:272-294.
- Cubero I, Puerto A (2000) Electrical stimulation of the insular cortex induces flavor-preferences in rats. *Brain Research* 872:134-140.

-D-

- Dardou D, Datiche F, Cattarelli M (2006) Fos and Egr1 expression in the rat brain in response to olfactory cue after taste-potentiated odor aversion retrieval. *Learning & Memory* 13:150-160.
- Dardou D, Datiche F, Cattarelli M (2007) Does taste or odor activate the same brain networks after retrieval of taste potentiated odor aversion? *Neurobiology of Learning & Memory* 88:186-197.
- Datiche F, Cattarelli M (1996) Reciprocal and topographic connections between the piriform and prefrontal cortices in the rat: a tracing study using the B subunit of the cholera toxin. *Brain Research Bulletin* 41:391-398.
- Davis HP, Squire LR (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychological Bulletin* 96:518-559.
- De Araujo IE, Rolls ET, Kringelbach ML, McGlone F, Phillips N (2003) Taste-olfactory convergence, and the representation of the pleasantness of flavour, in the human brain. *European Journal of Neuroscience* 18:2059-2068.
- Delacour R (1978) dans : "Neurobiologie de l'Apprentissage" (R Delacour, Eds.) Masson. 198-209.
- Descartes R (1629) Règle VIII dans *Les règles pour la direction de l'esprit* (œuvre inachevée voir l'essai de Carole Dely, *Descartes et la recherche de la Sagesse dans les Règles pour la direction de l'esprit*, 2006).
- Desmedt A, Hazvi S, Dudai Y (2003) Differential pattern of cAMP response element-binding protein activation in the rat brain after conditioned aversion as a function of the associative process engaged: taste versus context association. *Journal of Neuroscience* 23:6102-6110.
- Ding HK, Teixeira CM, Frankland PW (2008) Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learning & Memory* 15:290-293.

- Domjan M, Gillan D (1976) Role of novelty in the aversion for increasingly concentrated saccharin solutions. *Physiology and Behavior* 16:537-542.
- Dudai Y (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annual Review of Psychology* 55:51-86.
- Dunn LT, Everitt BJ (1988) Double dissociations of the effects of amygdala and insular cortex lesions on conditioned taste aversion, passive avoidance, and neophobia in the rat using the excitotoxin ibotenic acid. *Behavioral Neuroscience* 102:3-23.
- Duvarci S, Mamou CB, Nader K (2006) Extinction is not a sufficient condition to prevent fear memories from undergoing reconsolidation in the basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience* 24:249-260.
- Dwyer DM (2005) Reinforcer devaluation in palatability-based learned flavor preferences. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes* 31:487-492.

-E-

- Eisenberg M, Kobil T, Berman DE, Dudai Y (2003) Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science* 301:1102-1104.
- Elizalde G, Sclafani A (1988) Starch-based conditioned flavor preferences in rats: Influence of taste, calories, and CS-US delay. *Appetite* 11:179-200.
- Escobar ML, Chao V, Bermudez-Rattoni F (1998) In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Research* 779:314-319.
- Escobar ML, Alcocer I, Bermudez-Rattoni F (2002) In vivo effects of intracortical administration of NMDA and metabotropic glutamate receptors antagonists on neocortical long-term potentiation and conditioned taste aversion. *Behavioural Brain Research* 129:101-106.

-F-

- Fallon JH, Ciofi P (1992) Distribution of monoamines within the amygdala. In *The Amygdala: neurobiological aspects of emotion, memory and mental dysfunction* (JP Aggleton Eds.) pp. 97-114. Wiley-Lyss, New York.
- Fanselow MS, Birk J (1982) Flavor-flavor associations induce hedonic shifts in taste preference. *Animal Learning & Behavior* 10:223-228.
- Faurion A, Cerf B, Le Bihan D, Pillias AM (1998) fMRI study of taste cortical areas in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences* 855:535-545.

- Fernandez-Ruiz J, Miranda MI, Bermudez-Rattoni F, Drucker-Colin R (1993) Effects of catecholaminergic depletion of the amygdala and insular cortex on the potentiation of odor by taste aversions. *Behavioral Neural Biology* 60:189-191.
- Ferreira G, Gutierrez R, De La Cruz V, Bermudez-Rattoni F (2002) Differential involvement of cortical muscarinic and NMDA receptors in short- and long-term taste aversion memory. *European Journal of Neuroscience* 16:1139-1145.
- Ferreira G, Miranda MI, De la Cruz V, Rodriguez-Ortiz CJ, Bermudez-Rattoni F (2005) Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *European Journal of Neuroscience* 22:2596-2604.
- Ferreira G, Ferry B, Meurisse M, Levy F (2006) Forebrain structures specifically activated by conditioned taste aversion. *Behavioral Neuroscience* 120:952-962.
- Ferry B, Sandner G, Di Scala G (1995) Neuroanatomical and functional specificity of the basolateral amygdaloid nucleus in taste-potentiated odor aversion. *Neurobiology of Learning & Memory* 64:169-180.
- Ferry B, Oberling P, Jarrard LE, Di Scala G (1996) Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behavioral Neuroscience* 110:443-450.
- Ferry B, Di Scala G (1997) Bicuculline administration into basolateral amygdala facilitates trace conditioning of odor aversion in the rat. *Neurobiology of Learning & Memory* 67:80-83.
- Ferry B, Di Scala G (2000) Basolateral amygdala NMDA receptors are selectively involved in the acquisition of taste-potentiated odor aversion in the rat. *Behavioral Neuroscience* 114:1005-1010.
- Ferry B, Ferreira G, Traissard N, Majchrzak M (2006) Selective involvement of the lateral entorhinal cortex in the control of the olfactory memory trace during conditioned odor aversion in the rat. *Behavioral neuroscience* 120:1180-1186.
- Fortis-Santiago Y, Rodwin B, Katz DB (2008) Olfactory learning requires the taste system. *Abstract for SFN 2008*.
- Frankland PW, Bontempi B (2005) The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience* 6:119-130.
- Froloff N, Faurion A, Leod PM (1996) Multiple human taste receptor sites: a molecular modeling approach. *Chemical Senses* 21:425-445.
- Froloff N, Lloret E, Martinez JM, Faurion A (1998) Cross-adaptation and molecular modeling study of receptor mechanisms common to four taste stimuli in humans. *Chemical Senses* 23:197-206.
- Fu W, Sugai T, Yoshimura H, Onoda N (2004) Convergence of olfactory and gustatory connections onto the endopiriform nucleus in the rat. *Neuroscience* 126:1033-1041.

- Gale GD, Anagnostaras SG, Godsil BP, Mitchell S, Nozawa T, Sage JR, Wiltgen B, Fanselow MS (2004) Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. *Journal of Neuroscience* 24:3810-3815.
- Galef BG, Wigmore SW, Kennett DJ (1983) A failure to find socially mediated taste aversion learning in norway rats. *Journal of comparative psychology* 97:358-363.
- Galef BG, Jr., Attenborough KS, Whiskin EE (1990) Responses of observer rats (*Rattus norvegicus*) to complex, diet-related signals emitted by demonstrator rats. *Journal of Comparative Psychology* 104:11-19.
- Gall FJ (1822) *Sur l'origine des qualités morales et des facultés intellectuelles de l'homme et sur les conditions de leur manifestation*. Paris : Bouchet, 1822.
- Gallo M, Roldan G, Bures J (1992) Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behavioural Brain Research* 52:91-97.
- Garcia J, Kimeldorf DJ, Hunt EJ (1956) Conditioned responses to manipulative procedures resulting from exposure to gamma radiation. *Radiation Research* 5:79-87.
- Garcia J, Koelling RA (1966) A comparison of aversions induced by X rays, toxins and drugs in the rat. *Radiation Research Supplement* 7, 439-450.
- Garcia J, McGowan BK, Ervin FR, Koelling RA (1968) Cues: their relative effectiveness as a function of the reinforcer. *Science* 160:794-795.
- Garcia J, Hankins WG, Rusiniak KW (1974) Behavioral regulation of the milieu interne in man and rat. *Science* 185:824-831.
- Garcia J, Lasiter PS, Bermudez-Rattoni F, Deems DA (1985) A general theory of aversion learning. *Annals of the New York Academy of Sciences* 443:8-21.
- Gilbert PE, Campbell A, Kesner RP (2003) The role of the amygdala in conditioned flavor preference. *Neurobiology of Learning & Memory* 79:118-121.
- Gottfried JA, Deichmann R, Winston JS, Dolan RJ (2002) Functional heterogeneity in human olfactory cortex: an event-related functional magnetic resonance imaging study. *Journal of Neuroscience* 22:10819-10828.
- Grigson PS, Shimura T, Norgren R (1997) Brainstem lesions and gustatory function: III. The role of the nucleus of the solitary tract and the parabrachial nucleus in retention of a conditioned taste aversion in rats. *Behavioral Neuroscience* 111:180-187.
- Grigson PS, Shimura T, Norgren R (1997) Brainstem lesions and gustatory function: II. The role of the nucleus of the solitary tract in Na⁺ appetite, conditioned taste aversion, and conditioned odor aversion in rats. *Behavioral Neuroscience* 111:169-179.

- Grigson PS, Reilly S, Scalera G, Norgren R (1998) The parabrachial nucleus is essential for acquisition of a conditioned odor aversion in rats. *Behavioral Neuroscience* 112:1104-1113.
- Grill HJ, Norgren R (1978) Chronically decerebrate rats demonstrate satiation but not bait shyness. *Science* 201:267-269.
- Grossman SE, Fontanini A, Wieskopf JS, Katz DB (2008) Learning-related plasticity of temporal coding in simultaneously recorded amygdala-cortical ensembles. *Journal of Neuroscience* 28:2864-2873.
- Gruest N, Richer P, Hars B (2004) Emergence of long-term memory for conditioned aversion in the rat foetus. *Developmental Psychobiology* 44:189-198.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999) Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature Neuroscience* 2:1120-1124.
- Guzowski JF, Lyford GI, Stevenson GD, Houston FP, Mcgaugh JL, Worley PF, Barnes CA (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *Journal of Neuroscience* 20:3993-4001.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (2001) Imaging neural activity with temporal and cellular resolution using FISH. *Current Opinion in Neurobiology* 11:579-584.
- Guzowski JF, Timlin JA, Roysam B, McNaughton BL, Worley PF, Barnes CA (2005) Mapping behaviorally relevant neural circuits with immediate-early gene expression. *Current Opinion in Neurobiology* 15:599-606.

-H-

- Haberly LB, Price JL (1978) Association and commissural fiber systems of the olfactory cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 15:178(4):711-40.
- Han JH, Kushner SA, Yiu AP, Cole CJ, Matynia A, Brown RA, Neve RL, Guzowski JF, Silva AJ, Josselyn SA (2007) Neuronal competition and selection during memory formation. *Science* 316:457-460.
- Hanamori T, Kunitake T, Kato K, Kannan H (1998) Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *Journal of Neurophysiology* 79:2535-2545.
- Hankins WG, Garcia J, Rusiniak KW (1973) Dissociation of odor and taste in baitshyness. *Behavioral Biology* 8:407-419.

- Hatfield T, Graham PW, Gallagher M (1992) Taste-potentiated odor aversion learning: role of the amygdaloid basolateral complex and central nucleus. *Behavioral Neuroscience* 106:286-293.
- Hatfield T, Gallagher M (1995) Taste-potentiated odor conditioning: impairment produced by infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist into basolateral amygdala. *Behavioral Neuroscience* 109:663-668.
- Hebb DO (1949) *The organization of behavior; a neuropsychological theory*. Wiley-Interscience: New York.
- Helmstetter FJ, Parsons RG, Gafford GM (2008) Macromolecular synthesis, distributed synaptic plasticity, and fear conditioning. *Neurobiology of Learning & Memory* 89:324-337.
- Hepper PG (1988) Adaptive fetal learning: prenatal exposure to garlic affects postnatal preferences. *Animal Behaviour* 36:935-936.
- Holman EW (1975) Immediate and delayed reinforcers for flavor preferences in the rat. *Learning and Motivation* 6:91-100.
- Huff NC, Rudy JW (2004) The amygdala modulates hippocampus-dependent context memory formation and stores cue-shock associations. *Behavioral Neuroscience* 118:53-62.

-I-

- Inui T, Shimura T, Yamamoto T (2006) Effects of brain lesions on taste-potentiated odor aversion in rats. *Behavioral Neuroscience* 120:590-599.
- Ivanova SF, Bures J (1991) Acquisition of conditioned taste aversion in rats is prevented by tetrodotoxin blockade of a small midbrain region centered around the parabrachial nuclei. *Physiology & behavior* 48:543-549.
- Izquierdo I, Quillfeldt JA, Zanatta MS, Quevedo J, Schaeffer E, Schmitz PK, Medina JH (1997) Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. *European Journal of Neuroscience* 9:786-793.

-J-

- Johnson DM, Illig KR, Behan M, Haberly LB (2000) New features of connectivity in piriform cortex visualized by intracellular injection of pyramidal cells suggest that "primary"

olfactory cortex functions like "association" cortex in other sensory systems. *Journal of Neuroscience* 20:6974-6982.

Jones MW, French PJ, Bliss TV, Rosenblum K (1999) Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *Journal of Neuroscience* 19:RC36.

Jones SV, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ (2007) Differential regional expression of brain-derived neurotrophic factor following olfactory fear learning. *Learning & Memory* 14:816-820.

Josselyn SA, Kida S, Silva AJ (2004) Inducible repression of CREB function disrupts amygdala-dependent memory. *Neurobiology of Learning & Memory* 82:159-163.

-K-

Kiefer SW, Braun JJ (1977) Absence of differential associative responses to novel and familiar taste stimuli in rats lacking gustatory neocortex. *Journal of Comparative & Physiological Psychology* 91:498-507.

Kiefer SW, Rusiniak KW, Garcia J (1982) Flavor-illness aversions: gustatory neocortex ablations disrupt taste but not taste-potentiated odor cues. *Journal of Comparative & Physiological Psychology* 96:540-548.

Kiefer SW, Leach LR, Braun JJ (1984) Taste agnosia following gustatory neocortex ablation: dissociation from odor and generality across taste qualities. *Behavioral Neuroscience* 98:590-608.

Kilpatrick L, Cahill L (2003) Modulation of memory consolidation for olfactory learning by reversible inactivation of the basolateral amygdala. *Behavioral Neuroscience* 117:184-188.

Kim J, Ragozzino ME (2005) The involvement of the orbitofrontal cortex in learning under changing task contingencies. *Neurobiology of Learning & Memory* 83:125-133.

Kodama M, Yamada N, Sato K, Sato T, Morimoto K, Kuroda S (2001) The insular but not the perirhinal cortex is involved in the expression of fully-kindled amygdaloid seizures in rats. *Epilepsy Research* 46:169-178.

Koh MT, Bernstein IL (2003) Inhibition of protein kinase A activity during conditioned taste aversion retrieval: interference with extinction or reconsolidation of a memory? *Neuroreport* 14:405-407.

Krettek JE, Price JL (1977) Projections from the amygdaloid complex to the cerebral cortex and thalamus in the rat and cat. *Journal of Comparative Neurology* 172:687-722.

- Lamprecht R, Dudai Y (1995) Differential modulation of brain immediate early genes by intraperitoneal LiCl. *Neuroreport* 7:289-293.
- Lamprecht R and Dudai Y (2000) The amygdala in conditioned taste aversion: It's there, but where. In *The amygdala* (JP Aggleton Eds.), Oxford University Press, Oxford.
- Languille S, Gruet N, Richer P, Hars B (2008) The temporal dynamics of consolidation and reconsolidation decrease during postnatal development. *Learning & Memory* 15:434-442.
- Lasiter PS, Glanzman DL (1982) Cortical substrates of taste aversion learning: dorsal prepiriform (insular) lesions disrupt taste aversion learning. *Journal of Comparative & Physiological Psychology* 96:376-392.
- Lasiter PS (1983) Gastrointestinal reactivity in rats lacking anterior insular neocortex. *Behavioral Neural Biology* 39:149-154.
- Lasiter PS, Garcia J (1984) A methoxyflurane delivery system for stereotaxic surgery. *Brain Research Bulletin* 13:457-460.
- Laurent V, Westbrook RF (2008) Distinct contributions of the basolateral amygdala and the medial prefrontal cortex to learning and relearning extinction of context conditioned fear. *Learning and Memory* 15:657-666.
- LeDoux JE (2000) Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience* 23:155-184.
- Lee Y, Walker D, Davis M (1996) Lack of a temporal gradient of retrograde amnesia following NMDA-induced lesions of the basolateral amygdala assessed with the fear-potentiated startle paradigm. *Behavioral Neuroscience* 110:836-839.
- Le Magnen J, Tallon S (1968) Préférence alimentaire du jeune rat induite par l'allaitement maternel. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et ses Filiales*, 162, 387-390.
- Li W, Howard JD, Parrish TB, Gottfried JA (2008) Aversive learning enhances perceptual and cortical discrimination of indiscriminable odor cues. *Science* 319:1842-1845.
- Liang KC, McGaugh JL, Martinez JL, Jr., Jensen RA, Vasquez BJ, Messing RB (1982) Post-training amygdaloid lesions impair retention of an inhibitory avoidance response. *Behavioural Brain Research* 4:237-249.
- Liang KC, Hu SJ, Chang SC (1996) Formation and retrieval of inhibitory avoidance memory: differential roles of glutamate receptors in the amygdala and medial prefrontal cortex. *Chinese Journal of Physiology* 39:155-166.
- Lomber SG (1999) The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *Journal of Neuroscience Methods* 86:109-117.

Lubow RE, Moore AU (1959) Latent inhibition: the effect of nonreinforced pre-exposure to the conditional stimulus. *Journal of Comparative & Physiological Psychology* 52:415-419.

Lucas F, Sclafani A (1995) Carbohydrate-conditioned odor preferences in rats. *Behavioral Neuroscience* 109:446-454.

-M-

Mackintosh NJ (1991) Simple conditioning. In *Perspectives on Cognitive neuroscience*, (RG Lister & HJ Weingartner Eds.), pp 65-75 London: Oxford University Press, UK.

Mandairon N, Linster C (2009) Odor perception and olfactory bulb plasticity in adult mammals. *Journal of Neurophysiology*.

Maren S, Aharonov G, Fanselow MS (1996) Retrograde abolition of conditional fear after excitotoxic lesions in the basolateral amygdala of rats: absence of a temporal gradient. *Behavioral Neuroscience* 110:718-726.

Maren S, Yap SA, Goosens, KA (2001) The amygdala is essential for the development of neuronal plasticity in the medial geniculate nucleus during auditory fear conditioning in rats. *Journal of Neuroscience* 21:RC135:1-6.

Maren S, Ferrario CR, Corcoran KA, Desmond TJ, Frey KA (2003) Protein synthesis in the amygdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of Pavlovian fear conditioning in rats. *European Journal of Neuroscience* 18:3080-3088.

Marquis JP, Killcross S, Haddon JE (2007) Inactivation of the prelimbic, but not infralimbic, prefrontal cortex impairs the contextual control of response conflict in rats. *European Journal of Neuroscience* 25:559-566.

McDonald AJ (1998) Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology* 55:257-332.

McGaugh JL (2000) Memory--a century of consolidation. *Science* 287:248-251.

Meachum CL, Bernstein IL (1990) Conditioned responses to a taste conditioned stimulus paired with lithium chloride administration. *Behavioral Neuroscience* 104:711-715.

Mennella JA, Jagnow CP, Beauchamp GK (2001) Prenatal and postnatal flavor learning by human infants. *Pediatrics* 107 (6), e88.

Mickley GA, Schaldach MA, Snyder KJ, Balogh SA, Len T, Neimanis K, Goulis P, Hug J, Sauchak K, Remmers-Roeber DR, Walker C, Yamamoto BK (1998) Ketamine blocks a conditioned taste aversion (CTA) in neonatal rats. *Physiology & Behavior* 64:381-390.

- Milekic MH, Pollonini G, Alberini CM (2007) Temporal requirement of C/EBPbeta in the amygdala following reactivation but not acquisition of inhibitory avoidance. *Learning & Memory* 14:504-511.
- Miller JS, Nonneman AJ, Kelly KS, Neisewander JL, Isaac WL (1986) Disruption of neophobia, conditioned odor aversion, and conditioned taste aversion in rats with hippocampal lesions. *Behavioral Neural Biology* 45:240-253.
- Milner B (1972) Disorders of learning and memory after temporal lobe lesions in man. *Clinical Neurosurgery* 19:421-446.
- Mingaud F, Le Moine C, Etchamendy N, Mormede C, Jaffard R, Marighetto A (2007) The hippocampus plays a critical role at encoding discontinuous events for subsequent declarative memory expression in mice. *Hippocampus* 17:264-270.
- Miranda MI, LaLumiere RT, Buen TV, Bermudez-Rattoni F, McGaugh JL (2003) Blockade of noradrenergic receptors in the basolateral amygdala impairs taste memory. *European Journal of Neuroscience* 18:2605-2610.
- Miranda MI, McGaugh JL (2004) Enhancement of inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: involvement of the basolateral amygdala. *Learning & Memory* 11:312-317.
- Miranda MA, Ferry B, Ferreira G (2007) Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiology of Learning & Memory* 88:260-263.
- Miranda MI, Rodriguez-Garcia G, Reyes-Lopez JV, Ferry B, Ferreira G (2008) Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiology of Learning & Memory* 90:54-61.
- Moriceau S, Sullivan RM (2005) Neurobiology of infant attachment. *Developmental Psychobiology* 47:230-242.
- Moron I, Ballesteros MA, Candido A, Gallo M (2002) Taste aversion learning and aging: a comparison with the effect of dorsal hippocampal lesions in rats. *Physiological Research* 51 Suppl 1:S21-27.
- Morris R, Frey S, Kasambira T, Petrides M (1999) Ibotenic acid lesions of the basolateral, but not the central, amygdala interfere with conditioned taste aversion: evidence from a combined behavioral and anatomical tract-tracing investigation. *Behavioral Neuroscience* 113:291-302.
- Myers KP, Sclafani A (2006) Development of learned flavor preferences. *Developmental Psychobiology* 48:380-388.
- Myers KP (2007) Robust preference for a flavor paired with intragastric glucose acquired in a single trial. *Appetite* 48:123-127.

-N-

- Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature* 406:722-726.
- Nader K, Hardt O (2009) A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nature Reviews Neuroscience* 10:224-234.
- Navarro M, Cubero I (2003) Lateral parabrachial lesions impair lithium chloride-induced aversive responses but not saccharin-induced flavor preference. *Brain Research* 990:195-202.
- Nietzsche F (1888) *Ecce Homo*. Paris : Gallimard, 1956.
- Nijijima A, Yamamoto T (1994) The effects of lithium chloride on the activity of the afferent nerve fibers from the abdominal visceral organs in the rat. *Brain Research Bulletin* 35:141-145.
- Nowlis GH (1974) Conditioned stimulus intensity and acquired alimentary aversions in the rat. *Journal of Comparative & Physiological Psychology* 86:1173-1184.

-O-

- Onfray M (2006) *Contre-histoire de la philosophie : T.1 Les sagesses antiques*, Paris : Grasset, 2006, France.

-P-

- Packard MG, Knowlton BJ (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual Review of Neuroscience* 25:563-593.
- Pager J, Royet JP (1976) Some effects of conditioned aversion on food intake and olfactory bulb electrical responses in the rat. *Journal of Comparative & Physiological Psychology* 90:67-77.
- Palmerino CC, Rusiniak KW, Garcia J (1980) Flavor-illness aversions: the peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science* 208:753-755.
- Paradis S, Cabanac M, (2004) Flavor aversion learning induced by lithium chloride in reptiles but not in amphibians. *Behavioural Processes*, 67:11-18.
- Parent A (1996) Limbic system. In *Carpenter's human neuroanatomy*, 9th ed. pp. 744-794. Williams and Wilkins, Media.

- Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC (2006) Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science* 313:1141-1144.
- Pavlov IP (1927) *Conditioned reflexes*. London: Oxford University Press, UK.
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic, USA.
- Peto, E (1936) Contribution to the development of smell feeling. In J. Rickman (Ed.), *the British Journal of Medical Psychology*, Vol. XV, part 4, (pp.314-320). London: Cambridge University Press, UK.
- Petrulis A, Eichenbaum H (2003) The perirhinal-entorhinal cortex, but not the hippocampus, is critical for expression of individual recognition in the context of the Coolidge effect. *Neuroscience*, 122:599-607.
- Pfister JA, Müller-Schwarze D, Balph DF (1989) Effects of predator fecal odors on feed selection by sheep and cattle. *Journal of Chemical Ecology* 16: 573-583.
- Pierce J, Halpern BP (1996) Orthonasal and retronasal odorant identification based upon vapor phase input from common substances. *Chemical Senses* 21:529-543.
- Plath N et al. (2006) Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, 52:437-444.
- Platon *Le Théétète*. Paris : Flammarion 1994, France.
- Ponnusamy R, Poulos Am, Fanselow MS (2007) Amygdala-dependent and amygdala-independent pathways for contextual fear conditioning. *Neuroscience* 147:919-927.
- Price JL (1985) Beyond the primary olfactory cortex: olfactory-related areas in the neocortex, thalamus and hypothalamus. *Chemical Senses* 10:239–258.

-R-

- Ramirez-Amaya V, Vazdarjanova A, Mikhael D, Rosi S, Worley PF, Barnes CA (2005) Spatial exploration-induced Arc mRNA and protein expression: evidence for selective, network-specific reactivation. *Journal of Neuroscience* 25:1761-1768.
- Reed DR, Tanaka T, McDaniel AH (2006) Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. *Physiology & Behavior* 88:215-226.
- Reilly S, Grigson PS, Norgren R (1993) Parabrachial nucleus lesions and conditioned taste aversion: evidence supporting an associative deficit. *Behavioral Neuroscience* 107:1005-1017.

- Reilly S, Pritchard TC (1996) Gustatory thalamus lesions in the rat: II. Aversive and appetitive taste conditioning. *Behavioral Neuroscience* 110:746-759.
- Reilly S (1999) The parabrachial nucleus and conditioned taste aversion. *Brain Research Bulletin* 48:239-254.
- Reilly S, Bornovalova MA (2005) Conditioned taste aversion and amygdala lesions in the rat: a critical review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 29:1067-1088.
- Reijmers LG, Perkins BL, Matsuo N, Mayford M (2007) Localization of a stable neural correlate of associative memory. *Science* 317:1230-1233.
- Rescorla RA, Wagner AR (1972) *A theory of Pavlovian conditioning: Variations in the effectiveness of reinforcement and nonreinforcement*, Classical Conditioning II, AH Black and WF Prokasy, Eds., pp. 64-99. Appleton-Century-Crofts.
- Rescorla RA, Cunningham CL (1978) Within-compound flavor associations. *Journal of Experimental Psychology* 4:267-275.
- Ribot T (1881) *Les Maladies de la mémoire*. Paris : L'Harmattan, collection Encyclopédie psychologique, 2005, France.
- Roman C, Neieridze N, Sastre A, Reilly S (2006) Effects of lesions of the bed nucleus of the stria terminalis, lateral hypothalamus, or insular cortex on conditioned taste aversion and conditioned odor aversion. *Behavioral Neuroscience* 120:1257-1267.
- Romanski LM, Clugnet MC, Bordi F, LeDoux JE (1993) Somatosensory and auditory convergence in the lateral nucleus of the amygdala. *Behavioral Neuroscience* 107:444-450.
- Rosenblum K, Meiri N, Dudai Y (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behavioral Neural Biology* 59:49-56.
- Ross RS, McGaughy J, Eichenbaum H (2005) Acetylcholine in the orbitofrontal cortex is necessary for the acquisition of a socially transmitted food preference. *Learning & Memory* 12:302-306.
- Rozin P (1982) "Taste-smell confusions" and the duality of the olfactory sense. *Perception and Psychophysics* 31:397-401.
- Rusiniak KW, Hankins WG, Garcia J, Brett LP (1979) Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste in rats. *Behavioral Neural Biology* 25:1-17.
- Rusiniak KW, Palmerino CC, Rice AG (1982) Flavor-illness aversions potentiation of odor by taste with toxin but not shock in rats. *Journal of comparative & Physiological Psychology* 96:527-539.

- St Andre J, Reilly S (2007) Effects of central and basolateral amygdala lesions on conditioned taste aversion and latent inhibition. *Behavioral Neuroscience* 121:90-99.
- Sakai N, Yamamoto T (2001) Effects of excitotoxic brain lesions on taste-mediated odor learning in the rat. *Neurobiology of Learning & Memory* 75:128-139.
- Sakai N, Imada S (2003) Bilateral lesions of the insular cortex or of the prefrontal cortex block the association between taste and odor in the rat. *Neurobiology of Learning & Memory* 80:24-31.
- Saper CB, Loewy AD (1980) Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Research* 197:291-317.
- Saper CB (1982) Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *Journal of Comparative Neurology* 210:163-173.
- Scalera G, Spector AC, Norgren R (1995) Excitotoxic lesions of the parabrachial nuclei prevent conditioned taste aversions and sodium appetite in rats. *Behavioral Neuroscience* 109:997-1008.
- Schaal, B. (2005). From amnion to colostrum to milk: Odour bridging in early developmental transitions. In B. Hopkins & S. Johnson (Eds.), *Prenatal Development of Postnatal Functions* (pp. 52-102). Westport, CT: Praeger.
- Schaal B, Marlier L, Soussignan R (2000) Human fetuses learn odours from their pregnant mother's diet. *Chemical Senses* 25:729-737.
- Schafe GE, LeDoux JE (2000) Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *Journal of Neuroscience* 20:RC96.
- Sclafani A, Ackroff K (1994) Glucose- and fructose-conditioned flavor preferences in rats: taste versus postingestive conditioning. *Physiology & Behavior* 56:399-405.
- Sclafani A, Fanizza LJ, Azzara AV (1999) Conditioned flavor avoidance, preference, and indifference produced by intragastric infusions of galactose, glucose, and fructose in rats. *Physiology & Behavior* 67:227-234.
- Sclafani A, Azzara AV, Touzani K, Grigson PS, Norgren R (2001) Parabrachial nucleus lesions block taste and attenuate flavor preference and aversion conditioning in rats. *Behavioral Neuroscience* 115:920-933.
- Scott JW, Acevedo HP, Sherrill L, Phan M (2007) Responses of the rat olfactory epithelium to retronasal air flow. *Journal of Neurophysiology* 97:1941-1950.
- Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 20:11-21.
- Seligman MEP, Hager J (1972) *Biological Boundaries of Learning*. New York: Appleton-Century-Crofts, USA.

- Serrano P, Friedman EL, Kenney J, Taubenfeld SM, Zimmerman JM, Hanna J, Alberini C, Kelley AE, Maren S, Rudy JW, Yin JC, Sacktor TC, Fenton AA (2008) PKMzeta maintains spatial, instrumental, and classically conditioned long-term memories. *PLoS Biology* 6:2698-2706.
- Sevelinges Y, Gervais R, Messaoudi B, Granjon L, Mouly AM (2004) Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learning & Memory* 11:761-769.
- Sewards TV, Sewards MA (2001) Cortical association areas in the gustatory system. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 25:395-407.
- Shema R, Sacktor TC, Dudai Y (2007) Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science* 317:951-953.
- Shepherd GM (2006) Smell images and the flavour system in the human brain. *Nature* 444.
- Shi CJ, Cassell MD (1998) Cascade projections from somatosensory cortex to the rat basolateral amygdala via the parietal insular cortex. *Journal of Comparative Neurology* 399:469-491.
- Shi CJ, Cassell MD (1998) Cortical, thalamic, and amygdaloid connections of the anterior and posterior insular cortices. *Journal of Comparative Neurology* 399:440-468.
- Shionoya K, Moriceau S, Lunday L, Miner C, Roth TL, Sullivan RM (2006) Development switch in neural circuitry underlying odor-malaise learning. *Learning & Memory* 13:801-808.
- Shiple MT, Geinisman Y (1984) Anatomical evidence for convergence of olfactory, gustatory, and visceral afferent pathways in mouse cerebral cortex. *Brain Research Bulletin* 12:221-226.
- Shiple MT, Adamek GD (1984) The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Research Bulletin* 12:669-688.
- Skinner BF (1938) *The Behavior of Organisms: An Experimental Analysis*. New York: Appleton-Century, USA.
- Slotnick BM, Westbrook F, Darling FMC (1997) What the rat's nose tells the rat's mouth: Long delay aversion conditioning with aqueous and potentiation of taste by odors. *Animal Learning & Behavior* 25:357-369.
- Small DM, Gerber JC, Mak YE, Hummel T (2005) Differential neural responses evoked by orthonasal versus retronasal odorant perception in humans. *Neuron* 47:593-605.
- Small DM, Prescott J (2005) Odor/taste integration and the perception of flavor. *Brain Research* 166:345-357.
- Smith JC, Roll DL (1967) Trace conditioning with X-Rays as an aversive stimulus. *Psychonomic Science* 9, 11-12.

- Smith DV, St John SJ (1999) Neural coding of gustatory information. *Current opinion in neurobiology* 9:427-435.
- Smith CA, Countryman RA, Sahuque LL, Colombo PJ (2007) Time-courses of Fos expression in rat hippocampus and neocortex following acquisition and recall of a socially transmitted food preference. *Neurobiology of Learning & Memory* 88:65-74.
- Smotherman WP (1982) Odor aversion learning by the rat fetus. *Physiology & Behavior* 29:769-771.
- Soussignan R, Schaal B (2001) Les systèmes émotionnels chez le nouveau-né humain : invariance et malléabilité des réponses aux odeurs. *Enfance*, 3, 236-246.
- Spray KJ, Bernstein IL (2004) Afferent and efferent connections of the parvocellular subdivision of iNTS: defining a circuit involved in taste aversion learning. *Behavioural Brain Research* 154:85-97.
- Squire LR (2004) Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning & Memory* 82:171-177.
- Steiner JE, Glaser D, Hawilo ME, Berridge KC (2001) Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neuroscience Biobehavioral Review* 25:53-74.
- Stone ME, Grimes BS, Katz DB (2005) Hippocampal inactivation enhances taste learning. *Learning & Memory* 12:579-586.

-T-

- Takahashi LK, Nakashima BR, Hong H, Watanabe K (2005) The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neuroscience Biobehavioral Reviews* 29:1157-1167.
- Tehovnik EJ, Sommer MA (1997) Effective spread and timecourse of neural inactivation caused by lidocaine injection in monkey cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods* 74:17-26.
- Tolman EC (1948) Cognitive maps in the rats and man. *Psychological Review* 55, 189-208.
- Touzani K, Sclafani A (2005) Critical role of amygdala in flavor but not taste preference learning in rats. *European Journal of Neuroscience* 22:1767-1774.
- Touzani K, Sclafani A (2007) Insular cortex lesions fail to block flavor and taste preference learning in rats. *European Journal of Neuroscience* 26:1692-1700.
- Tronel S, Sara SJ (2002) Mapping of olfactory memory circuits: region-specific c-fos activation after odor-reward associative learning or after its retrieval. *Learning & Memory* 9:105-111.

- Tronel S, Sara SJ (2003) Blockade of NMDA receptors in prelimbic cortex induces an enduring amnesia for odor-reward associative learning. *Journal of Neuroscience* 23:5472-5476.
- Tronel S, Feenstra MG, Sara SJ (2004) Noradrenergic action in prefrontal cortex in the late stage of memory consolidation. *Learning & Memory* 11:453-458.
- Truchet B, Chaillan FA, Soumireu-Mourat B, Roman FS (2002) Learning and memory of cue-reward association meaning by modifications of synaptic efficacy in dentate gyrus and piriform cortex. *Hippocampus* 12:600-608.
- Tulving E (1985) How many memory systems are there? *American Psychologist* 40, 385-398.

-V-

- Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M (1997) Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science* 277:376-380.
- Verheyden-Tixier H, Duncan P, Ballon P, Guillon N (1998) Selection of hardwood saplings by European roe deer: effects of variation in the availability of palatable species and of understory vegetation. *Terre et Vie* 53, 245-25

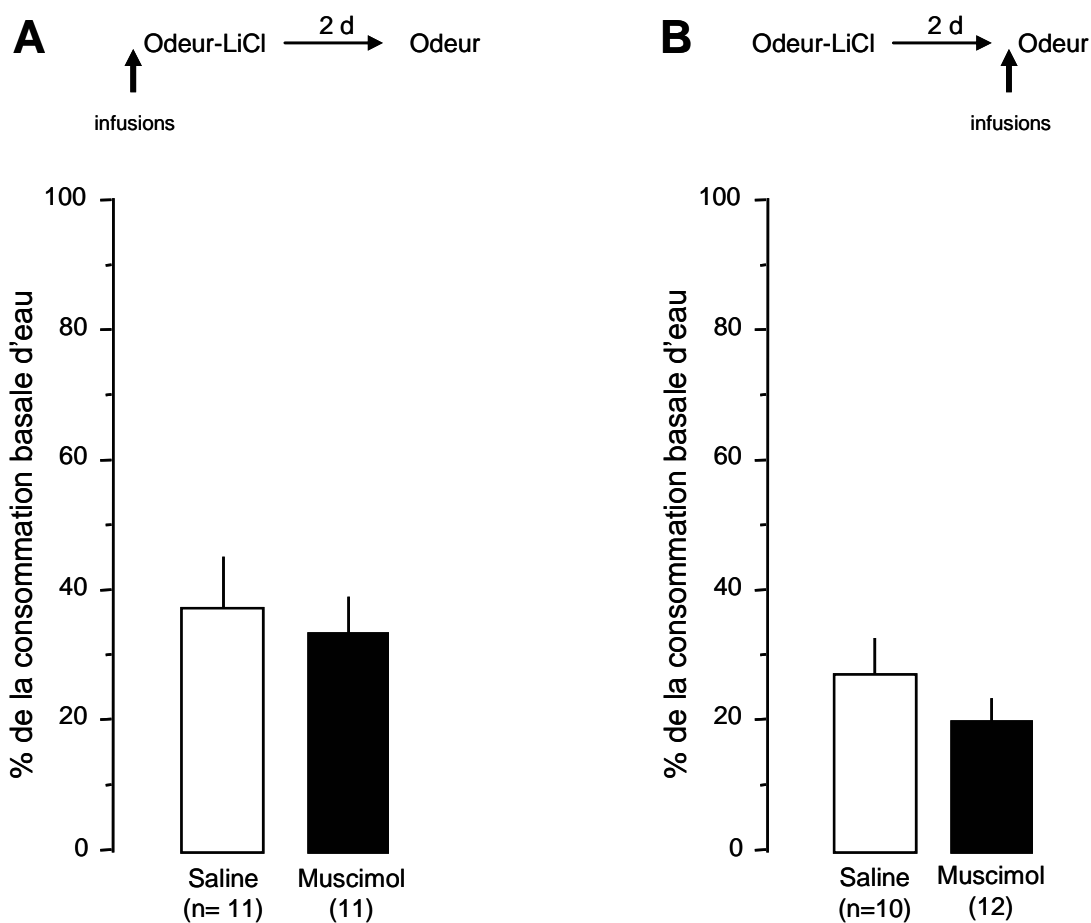
-W-

- Walker DL, Paschall GY, Davis M (2005) Glutamate receptor antagonist infusions into the basolateral and medial amygdala reveal differential contributions to olfactory vs. context fear conditioning and expression. *Learning & Memory* 12:120-129.
- Wang Y, Fontanini A, Katz DB (2006) Temporary basolateral amygdala lesions disrupt acquisition of socially transmitted food preferences in rats. *Learning and Memory* 13:794-800.
- Wiltgen BJ, Sanders MJ, Anagnostaras SG, Sage JR, Fanselow MS (2006) Context fear learning in the absence of the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 26:5484-5491.
- Witter MP, Room P, Groenewegen HJ, Lohman AH (1988) Reciprocal connections of the insular and piriform claustrum with limbic cortex: an anatomical study in the cat. *Neuroscience* 24:519-539.

- Yamamoto T, Azuma S, Kawamura Y (1984) Functional relations between the cortical gustatory area and the amygdala: electrophysiological and behavioral studies in rats. *Brain Research* 56:23-31.
- Yamamoto T (1993) Neural mechanisms of taste aversion learning. *Neuroscience Research* 16:181-185.
- Yamamoto T, Shimura T, Sako N, Yasoshima Y, Sakai N (1994) Neural substrates for conditioned taste aversion in the rat. *Behavioural Brain Research* 65:123-137.
- Yamamoto T, Fujimoto Y, Shimura T, Sakai N (1995) Conditioned taste aversion in rats with excitotoxic brain lesions. *Neuroscience Research* 22:31-49.
- Yamamoto T, Sako N, Sakai N, Iwafune A (1997) Gustatory and visceral inputs to the amygdala of the rat: conditioned taste aversion and induction of c-fos-like immunoreactivity. *Neuroscience Letters* 226:127-130.
- Yasoshima Y, Morimoto T, Yamamoto T (2000) Different disruptive effects on the acquisition and expression of conditioned taste aversion by blockades of amygdalar ionotropic and metabotropic glutamatergic receptor subtypes in rats. *Brain Research*:15-24.
- Yuan CS, Barber WD (1991) Parabrachial nucleus: neuronal evoked responses to gastric vagal and greater splanchnic nerve stimulation. *Brain Research Bulletin* 27:797-803.

ANNEXE

Annexe



Absence d'effet de l'inactivation du cortex orbitofrontal sur l'acquisition (A) et le rappel récent (B) de l'AOC.

Les animaux ont reçu au niveau du cortex orbitofrontal (+3.2 mm AP / Bregma ; ± 3 mm Lat / Bregma ; -3.5 mm V / Bregma; Paxinos et Watson, 1998) une infusion bilatérale de saline (0.5 μ l/côté) ou de muscimol (0.5 μ g/0.5 μ l/côté). Le jour de l'acquisition les animaux reçoivent une solution odorisée à la banane (0.01% acétate d'isoamyl dilué dans l'eau) suivie 30 min plus tard d'une injection i.p. de LiCl (125 mg/kg). La solution odorisée est à nouveau présentée le jour du rappel et la quantité consommée est relevée. L'aversion est exprimée en % de la consommation basale d'eau.

LISTE DES COMMUNICATIONS

Liste des communications

Posters

Desgranges Bertrand, Ferry Barbara, Ravel Nadine, Lévy Frédéric & Ferreira Guillaume (février 2006) *Differential involvement of insular cortex and basolateral amygdala in conditioned olfactory and taste aversions*. Journée AROMAGRI, Versailles.

Desgranges Bertrand, Ferry Barbara, Ravel Nadine, Lévy Frédéric & Ferreira Guillaume (avril 2006) *Differential involvement of insular cortex and basolateral amygdala in conditioned olfactory and taste aversions*. Congrès Fondation IPSEN, Paris.

Desgranges Bertrand, Ravel Nadine, Ferry Barbara, Lévy Frédéric & Ferreira Guillaume (mai 2007) *Requirement of protein synthesis in basolateral amygdala for conditioned odor aversion memory formation in the rat*. Congrès des Neurosciences Françaises, Montpellier.

Meurisse Maryse, Desgranges Bertrand, Ravel Nadine, Lévy Frédéric & Ferreira Guillaume (mai 2007) *Effect of insular and orbitofrontal cortex inactivation on conditioned odor aversion in rat*. Congrès des Neurosciences Françaises, Montpellier.

Desgranges Bertrand, Ravel Nadine, Ferry Barbara, Lévy Frédéric & Ferreira Guillaume (octobre 2007) *Requirement of protein synthesis in basolateral amygdala for conditioned odor aversion memory formation in the rat*. Journées Département PHASE, Tours.

Desgranges Bertrand, Ricaño-Cornejo Itzel , Ramirez-Amaya Victor & Ferreira Guillaume (juillet 2008) *Increase of the odor-taste response in Basolateral Amygdale after a conditioned olfactory preference in rat*. Congrès des Neurosciences Européennes (FENS), Genève.

Desgranges Bertrand, Ricaño-Cornejo Itzel , Ramirez-Amaya Victor & Ferreira Guillaume (novembre 2008) *Increase of the odor-taste response in Basolateral Amygdale after a conditioned olfactory preference in rat*. Society for Neurosciences (SFN), Washington.

Desgranges Bertrand, Ricaño-Cornejo Itzel , Ramirez-Amaya Victor & Ferreira Guillaume (novembre 2008) *Increase of the odor-taste response in Basolateral Amygdale after a conditioned olfactory preference in rat*. Society for Neurosciences (SFN), Washington.

Communications orales

Forum école doctorale université Tours-Rabelais, « Structures cérébrales impliquées dans la mémorisation d'une aversion olfactive conditionnée » 16 juin 2007.

Bertrand DESGRANGES

ETUDE DES APPRENTISSAGES OLFACTIFS ALIMENTAIRES :

Importance de l'amygdale basolatérale et du
cortex insulaire chez le rat

Résumé

Dans la perspective de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les apprentissages olfactifs alimentaires, nous avons investigué les bases neurobiologiques de l'aversion olfactive conditionnée (AOC) et de la préférence olfactive conditionnée (POC). Nous nous sommes intéressés au rôle joué par deux structures de convergence des informations olfactives, gustatives et viscérales, le noyau basolatéral de l'amygdale (NBL) et le cortex insulaire (CI). Une approche pharmacologique nous permet de montrer que le NBL est indispensable à l'acquisition, la consolidation et le rappel de l'AOC. A contrario, le CI n'est nécessaire à aucune de ces étapes mnésiques. Grâce à une technique d'imagerie cellulaire (catFISH), nous observons que l'apprentissage de la POC s'accompagne d'une augmentation de la convergence des informations odeur-goût au sein des neurones du NBL mais pas du CI, due à un recrutement d'une nouvelle population neuronale. Que l'approche soit systémique ou cellulaire, qu'elle intéresse un apprentissage aversif ou appétitif, nos études soulignent l'importance du NBL dans la mémoire olfactive alimentaire.

Mots-clés : aversion, goût, mémoire, odeur, préférence.

Abstract

To better understand the mechanisms involved in food olfactory learning, the neurobiological basis of conditioned odor aversion (COA) and the conditioned odor preference (COP) were investigated. We study the basolateral amygdala (BLA) and the insular cortex (IC), which receive olfactory, gustatory and visceral information. Using a pharmacological approach, we show that the BLA is involved in acquisition, consolidation and both recent and remote memory retrieval of COA. By contrast, the IC is not necessary to any of these memory phases. Using a cellular imaging technique (catFISH), we find that COP leads to an increase of odor-taste convergence onto individual neurons in the BLA, but not the IC, by means of the recruitment of a new population. Whether the approach is systemic or cellular and the learning is aversive or appetitive, our study highlights the importance of the BLA in food olfactory learning.

Key words: aversion, learning, memory, odor, preference, taste.

Critical role of insular cortex in taste but not odour aversion memory

Desgranges Bertrand,¹ Sevelinges Yannick,¹ Bonnefond Mathilde,^{1,2} Lévy Frédéric,¹ Ravel Nadine² and Ferreira Guillaume¹

¹Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, CNRS UMR6175, INRA UMR85, Université Tours, F-37380 Nouzilly, France

²Laboratoire de Neurosciences Sensorielles, Comportementales et Cognitives, CNRS UMR5020, Université Lyon I, 50 avenue Tony Garnier, F-69366 Lyon, France

Keywords: acquisition, amygdala, consolidation, flavour, learning, retrieval

Abstract

Conditioned odour aversion (COA) and conditioned taste aversion (CTA) result from the association of a novel odour or a novel taste with delayed visceral illness. The insular cortex (IC) is crucial for CTA memory, and the present experiments sought to determine whether the IC is required for the formation and the retrieval of COA memory as it is for CTA. We first demonstrated that ingested odour is as effective as taste for single-trial aversion learning in rats conditioned in their home cage. COA, like CTA, tolerates long intervals between the ingested stimuli and the illness and is long-lasting. Transient inactivation of the IC during acquisition spared COA whereas it greatly impaired CTA. Similarly, blockade of protein synthesis in IC did not affect COA but prevented CTA consolidation. Moreover, IC inactivation before retrieval tests did not interfere with COA memory expression when performed either 2 days (recent memory) or 36 days after acquisition (remote memory). Similar IC inactivation impaired the retrieval of either recent or remote CTA memory. Altogether these findings indicate that the IC is not necessary for aversive odour memory whereas it is essential for acquisition, consolidation and retrieval of aversive taste memory. We propose that the chemosensory stimulations modulate IC recruitment during the formation and the retrieval of food aversive memory.

Introduction

Conditioned taste aversion (CTA) and conditioned odour aversion (COA) are based on the association between the chemosensory characteristics of food [conditioned stimulus (CS)] with visceral malaise [unconditioned stimulus (US)]. Taste was long considered the critical CS for food aversion in comparison to odour (Palmerino *et al.*, 1980; Garcia *et al.*, 1985). However, it has been demonstrated more recently that when odour is mixed with water, instead of being delivered close to the solution, odour is as effective as taste for illness: it requires a single trial, resists a CS–US delay of several hours and can be recalled several weeks after acquisition (Slotnick *et al.*, 1997; Chapuis *et al.*, 2007a).

Compared with CTA (Bermudez-Rattoni, 2004), much less is known about neural bases of COA. Pharmacological studies have demonstrated the crucial role of the basolateral amygdala (BLA) in COA (Ferry *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2007; Desgranges *et al.*, 2008; Sevelinges *et al.*, 2008, 2009). Another likely site for the integration of odour with toxicosis is the insular cortex (IC) as it receives both olfactory and visceral inputs, in addition to gustatory information (Sewards & Sewards, 2001). The functional necessity of

the IC has been demonstrated in CTA (Bermudez-Rattoni, 2004), but permanent IC lesion did not affect COA (Kiefer *et al.*, 1982, 1984; Lasiter *et al.*, 1985; Roman *et al.*, 2006). However, we have recently reported in rats using electrophysiological recordings that the IC is specifically activated by a tasteless odour after COA conditioning (Chapuis *et al.*, 2007b). In addition, temporary inactivation of the IC impaired the learning of an odour–odour association task, the social transmission of food preferences (Fortis-Santiago *et al.*, 2008). This olfactory learning impairment was induced by transient IC inactivation whereas the absence of COA impairment was obtained after permanent IC lesion. Because functional recovery after lesion could challenge the normal involvement of the IC in COA, we propose to reinvestigate the importance of IC in COA memory formation and retrieval using transient pharmacological manipulations. According to the importance of IC in CTA memory (Bermudez-Rattoni, 2004), we compare the effects of IC manipulations on COA and CTA.

The experimental framework used in COA studies (experimental chamber outside the home cage, operant/instrumental conditioning; Slotnick *et al.*, 1997; Chapuis *et al.*, 2007a) was quite different from the one generally used in CTA studies (home cage with free access to CS). Therefore, we first assessed in the same experimental condition, i.e. the home cage with free access to bottles during conditioning and test, whether the ingested odour is as effective as taste for single-trial aversion learning with long CS–US intervals. Then, we evaluated the

Correspondence: Dr F. Guillaume, as above.

E-mail: ferreira@tours.inra.fr

Received 6 November 2008, revised 21 January 2009, accepted 15 February 2009

importance of IC in COA and CTA acquisition by transient cortical inactivation and on consolidation by protein synthesis blockade (Davis & Squire, 1984; Dudai, 2004; Alberini, 2008). Finally, we evaluated the involvement of IC neural activity for retrieval of COA and CTA memories. Because cortical structures may play a key role in the expression of remote, but not recent, memory (Frankland & Bontempi, 2005), transient IC inactivation was realized before retrieval test of either recent (2 days old) or remote (36 days old) memory of COA and CTA.

Materials and methods

Subjects

Subjects were 308 adult male Wistar rats (Janvier, France; 250–350 g at the time of surgery). They were housed individually at 25°C in plastic boxes and maintained on a 12-h light/dark cycle. All behavioural manipulations were carried out during the light phase, approximately between 22:00 and 24:00 h. Food and water were provided *ad libitum* until the beginning of the behavioural procedures. Experiments were performed in accordance with French and European regulations concerning animal experimentation, including authorizations 006352 and A37801 from the French Ministry of Agriculture to perform experiments, and ECC directive 86/609/EEC.

Surgery

Animals were anaesthetized with ketamine (70 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg) administered by intraperitoneal injection. They were then implanted with two 15-mm stainless steel guide cannulae (23-gauge; Plastic One, Roanoke, VA, USA) using a standard stereotaxic frame (Kopf Instruments, Bioseb, France). Guide cannulae were bilaterally implanted into the IC (antero-posterior, +1.2 mm relative to Bregma; lateral, ± 5.5 mm from midline; ventral, -4.1 mm from Bregma; Paxinos & Watson, 1998). The rostro-caudal position was chosen according to previous studies indicating neurons responding to olfactory and gustatory stimulations in the central IC (for review, see Sewards & Sewards, 2001), and because CTA learning was disrupted by lesions in the central but not in the anterior or posterior IC (Nerad *et al.*, 1996). The tips of the guide cannulae were aimed 2.0 mm above the dorsal IC, i.e. the granular and dysgranular layers, and 3 mm above the ventral IC, i.e. the agranular layer. The guide cannulae were fixed to the skull with dental acrylic cement and anchored with two surgical screws placed in the skull. Stylets were inserted into the guide cannulae to prevent clogging. Then rats were allowed 1 week to recover from surgery.

Drug and infusion procedures

The anaesthetic lidocaine hydrochloride (Lido, Sigma, France) was dissolved in sterile 0.9% saline (Sal) solution to obtain a final concentration of 4%. Vehicle controls received sterile Sal. Lido reduces sodium conduction by blocking voltage-gated sodium channels, thereby preventing membrane depolarization and conduction of the action potential. The dose of Lido was selected on the basis of previous findings reporting a complete inhibition of neural activity within 5 min after infusion that lasts for 20–30 min (Tehovnik & Sommer, 1997; Lomber, 1999; Boehnke & Rasmusson, 2001). Thus, pre-training infusion was thought to induce a functional inactivation of the IC that was limited to the acquisition.

The protein synthesis inhibitor, anisomycin (Ani; Sigma) was dissolved with HCl, adjusted to pH ~ 7.2 with NaOH, and brought to a

final concentration of 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ with sterile Sal. Vehicle controls received Sal. The dose and volume of Ani, 100 μg in 1 μL , were chosen according to previous studies indicating that it resulted in more than 90% inhibition of protein synthesis within 20 min after IC infusion and sustained for more than 90 min (Rosenblum *et al.*, 1993). This Ani infusion in IC impaired long- but not short-term CTA memory (Rosenblum *et al.*, 1993; Berman & Dudai, 2001; Berman *et al.*, 2003).

All animals were handled individually for approximately 3 min each day during the last 3 days before infusion for manipulation habituation. During infusion day, rats were gently restrained by hand, stylets were removed and injection needles (30-gauge) were inserted, extending 2 mm from the tip of the guide cannula, i.e. reaching mainly the dorsal part of the IC corresponding to the granular and dysgranular layers. This infusion allowed us to limit the spread of Lido or Ani to the piriform cortex, located ventral to the IC. In one experiment, Lido was infused 1 mm more ventrally (with needles extending 3 mm from the tip of the guide cannula) to better inactivate the ventral part of the IC, i.e. the agranular layer. The injection needles were connected via polyethylene tubing to two 10- μL Hamilton microsyringes driven by an automated microinfusion pump (Harvard Apparatus, Bioseb, France). A total volume of 0.5 μL for Lido or 1 μL for Ani per hemisphere was delivered over 1 min or 2 min, respectively. After the injections, the needles were left in position for an additional minute to allow diffusion of the solution into the tissue and to minimize dragging of the liquid along the injection track.

Behavioural procedures

Dynamic of COA and CTA establishment

The aim was to assess in the home cage whether odours are as effective as tastes in signaling illness when there are long intervals between the presentation of the CS and the illness. We also evaluated the specificity and the retention of the aversion.

Rats were deprived of water for 24 h and then habituated to drink tap water from a single graded bottle (with 0.5 mL accuracy) for 15 min/day for 5 days (between 22:00 and 24:00 h) in the home cage. On the acquisition day, rats were divided into two groups and received the targeted solution, i.e. banana-scented water composed of 0.01% isoamyl acetate (Iso; Sigma; $n = 30$) or a sweet taste composed of 0.1% saccharin solution (Sac; Sigma; $n = 29$) for 15 min. Previous research used anosmic rats to confirm that processing of 0.01% Iso solution is mediated by its odour properties, not by its taste properties (Slotnick *et al.*, 1997), whereas processing of 0.1% Sac solution is mediated by its taste properties, but not its odour properties (Rusiniak *et al.*, 1979). Then, the rats received an intraperitoneal injection of the visceral malaise-inducing drug lithium chloride (LiCl, 125 mg/kg, 0.4 M, 7.5 mL/kg; Sigma) 15 min (Iso, $n = 6$; Sac, $n = 6$), 60 min (Iso, $n = 9$; Sac, $n = 10$), 120 min (Iso, $n = 9$; Sac, $n = 7$) or 240 min (Iso, $n = 6$; Sac, $n = 6$) after the end of the CS presentation. For the next day, rats had access to water for 15 min in order to reestablish water baseline intake. After this day, odour and taste aversions were assessed by providing Iso and Sac solution for 15 min. The percentage of Iso or Sac consumption during testing with respect to consumption during water baseline (the last 2 days before acquisition) was used as a measure of aversion strength. We previously demonstrated in similar experimental conditions that conditioned animals with a CS-US interval of 15 or 30 min showed odour or taste aversion ranging from 15% to 40% of water baseline consumption (Miranda *et al.*, 2007, 2008; Desgranges *et al.*, 2008; Sevelinges *et al.*, 2008, 2009), whereas unconditioned animals (injected with Sal instead of LiCl) did not show

any aversion consuming Iso at the level of water baseline (i.e. 100%, data not shown; see Chapuis *et al.*, 2007a). To assess the sensory specificity of the aversion, animals conditioned with a CS–US interval of 60 min with Iso ($n = 9$) were also tested with Sac, and animals conditioned with Sac ($n = 10$) were tested with Iso.

We also compare the long-term retention of COA and CTA in other animals. They were conditioned with either Iso ($n = 8$) or Sac ($n = 8$) with a CS–US interval of 15 min. Odour or taste aversions were assessed 36 days after acquisition by providing Iso or Sac solution for 15 min. In these conditions, water was provided *ad libitum* the day after acquisition and during 30 days. Rats were then deprived of water for 24 h and rehabilitated to drink tap water from a single graded bottle for 15 min/day for 5 days before testing. The percentage of Iso or Sac consumption during testing with respect to water baseline consumption during the last 2 days before testing was used as a measure of aversion strength.

Effect of Lido and Ani infusions in IC on COA and CTA memory formation

In a first series of experiments, rats received bilateral IC injections of Lido or Sal immediately before CS presentation on the day of either COA (Lido, $n = 14$; Sal, $n = 12$) or CTA acquisition (Lido, $n = 9$; Sal, $n = 9$) with a CS–US interval of 15 min. The aversion was tested 2 days later. The protocol was similar to that described above with the exception that animals received 10 mL of the CS (banana odour or sweet taste) the day of acquisition. This volume was chosen because it allows an optimal CS–US association (Miranda *et al.*, 2007, 2008; Desgranges *et al.*, 2008) and a similar CS intake for control and experimental groups.

Three other experiments were realized to further evaluate the effect of Lido infusion in IC on COA acquisition. In order to better inactivate the ventral agranular layer of the IC that received predominantly the olfactory inputs (Sewards & Sewards, 2001), some rats received deeper IC injections of Lido ($n = 9$) or Sal ($n = 9$) immediately before Iso presentation (with needles extending 3 mm instead of 2 mm from the tip of the guide cannula).

To exclude the possibility that the effect of IC inactivation is unique to the CS used, we replaced banana odour with almond odour. Some rats received bilateral IC injections of Lido ($n = 9$) or Sal ($n = 10$) immediately before COA acquisition using almond-scented water composed of 0.01% benzaldehyde (Sigma) as CS. We have recently shown that COA with almond-scented water is reliable but lower than COA with banana-scented water (Sevelinges *et al.*, 2008). However, the almond odour was chosen because previous research indicates that at this concentration its processing is mediated by its odour properties, not by its taste properties (Rusiniak *et al.*, 1979).

We also evaluated the effect of IC inactivation immediately after CS presentation to assess whether the IC is important for the short-term maintenance of the odour CS. For this purpose, rats received bilateral IC injections of Lido ($n = 9$) or Sal ($n = 9$) immediately after Iso presentation on the day of COA acquisition.

In a second series of experiments, we evaluated the effect of blockade of protein synthesis in IC by Ani infusion on COA and CTA memory consolidation. Rats received bilateral IC injections of Ani or Sal 25 min before CS presentation on the day of COA (Ani, $n = 9$; Sal, $n = 9$) or CTA acquisition (Ani, $n = 9$; Sal, $n = 9$). The aversion was tested 2 days later.

Effect of Lido infusion in IC on COA and CTA memory retrieval

In a first experiment, rats received bilateral IC injections of Lido or Sal immediately before the test performed 2 days (recent memory) after

acquisition of either COA (Lido, $n = 18$; Sal, $n = 21$) or CTA (Lido, $n = 9$; Sal, $n = 7$).

In a second experiment, rats received bilateral IC injections of Lido or Sal immediately before the test performed 36 days (remote memory) after acquisition of either COA (Lido, $n = 8$; Sal, $n = 8$) or CTA (Lido, $n = 9$; Sal, $n = 7$).

Histology

After completion of behavioural experiments, animals were deeply anaesthetized with 1 mL i.p. injection of sodium pentobarbital (100 mg/kg), and perfused transcardially with 0.9% Sal. The brains were removed and stored at 4°C in a 4% paraformaldehyde solution during 24 h. They were then soaked in 30% sucrose solution. Forty-micrometer-thick sections were cut through the areas of interest in the frontal plane with a cryostat (Leica, Paris, France) and kept at 4°C. Sections were collected in 24-well plates containing phosphate-buffered saline and 0.1% sodium azide. Mounted samples were stained with Cresyl violet and then examined microscopically to determine the correct placement of the cannulae. Figure 1 shows two representative infusion sites within the IC. Data from 11 rats (in addition to the 222 operated rats included in the different groups) were discarded from the final statistical analyses because of misplacement of one or both cannulae.

Statistics

Data were analysed with Student's paired *t*-test for intra-groups comparisons. Inter-groups comparisons were evaluated using Student's unpaired *t*-test, one-way or two-way ANOVA followed by the Fisher's test for *post hoc* analysis. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

Results

Ingested odour is as effective as taste for aversion learning

To first assess whether COA and CTA could be induced in the same experimental procedure (the home cage) with long CS–US intervals, we compared performances of rats conditioned with odour or taste with four different delays between CS and illness, i.e. 15, 60, 120 and 240 min (Fig. 2A). There was no difference between the eight groups during the days of water baseline ($F_{7,51} = 1.7$, $P > 0.1$; mean water intake: 13.6 ± 0.2 mL) and the day of acquisition ($F_{7,51} = 1.8$, $P > 0.1$; mean Iso intake: 11.1 ± 0.5 mL, mean Sac intake: 10.7 ± 0.4 mL). During the next day, all groups reestablished water baseline intake (paired *t*-test, $t_{58} = 1.7$, $P \geq 0.1$). Figure 2A shows the percentage of Iso or Sac intake during the test performed 2 days after acquisition with respect to water baseline intake. Aversion was acquired differentially by the groups, depending on the CS–US delay: groups conditioned with a 15- and 60-min delay demonstrated a clear aversion as indicated by a CS intake $\leq 50\%$ of water baseline consumption, groups conditioned with a 120-min delay showed a weak aversion, and groups conditioned with 240-min delay did not acquire aversion as indicated by a percentage close to 100. This description was confirmed by a two-way ANOVA indicating a significant effect of the delay ($F_{3,51} = 33.2$; $P < 0.001$), but no effect of the CS ($F_{1,51} < 1$) or of interaction between these two variables ($F_{3,51} < 1$). *Post hoc* analysis revealed for each CS a similar high aversion for groups conditioned with 15- and 60-min delay ($P > 0.1$), a higher aversion of these two groups in comparison to groups conditioned with 120- and 240-min delay ($P < 0.01$), and a higher

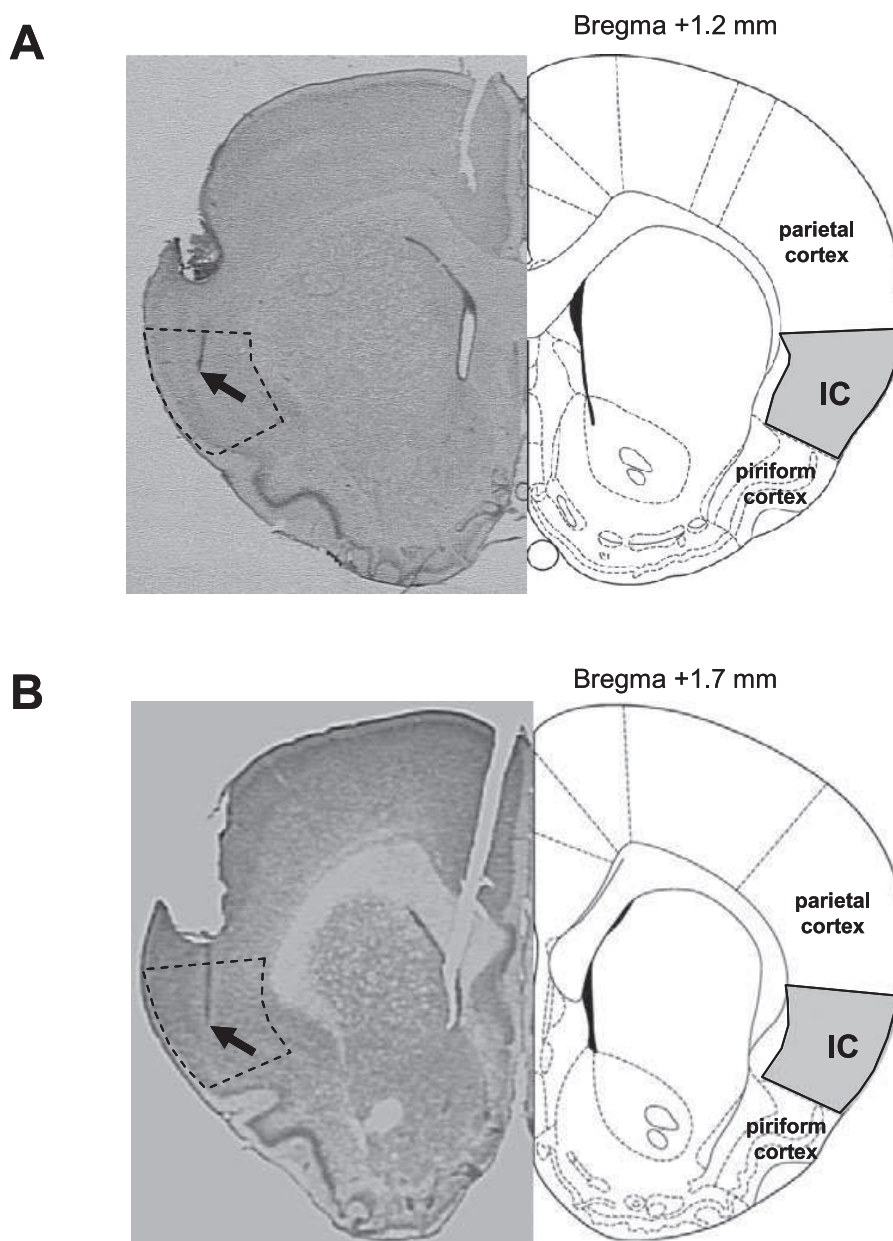


FIG. 1. Photomicrographs illustrating placement of cannulae and needle tips into the insular cortex (IC) on two different rats (A, B). The arrow points to the needle tips.

aversion in groups conditioned with 120-min compared with groups conditioned with 240-min delay ($P < 0.05$). Moreover, there was no difference between taste and odour aversion for each delay. This indicates that ingested odour is as effective as taste for single-trial aversion learning, and the effectiveness was directly related to the delay between CS and US.

In order to assess the sensory specificity of the aversion, rats conditioned with Iso (with 60-min delay) were also tested with Sac, and rats conditioned with Sac (with 60-min delay) were also tested with Iso. Rats with clear aversion to Iso ($30 \pm 6\%$ of the water baseline consumption, $n = 9$) did not avoid Sac ($104 \pm 13\%$), and rats highly aversive to Sac ($26 \pm 5\%$, $n = 10$) did not avoid Iso ($103 \pm 7\%$). This indicates that odour aversion did not generalize to taste and taste aversion did not generalize to odour.

We then compared the long-term retention of COA with CTA in other animals. The groups showed similar consumption during

acquisition (unpaired t -test, $t_{14} < 1$) and during water baseline established on the 2 days before the retrieval test ($t_{14} = 1.1$, $P > 0.1$). Figure 2B shows the percentage of Iso or Sac intake during the test performed 36 days after acquisition with respect to water baseline intake (during the last 2 days before the test). Both groups exhibited a high aversion as indicated by a CS intake $\leq 25\%$ of water baseline consumption, and COA tended to be higher than CTA ($t_{14} = 1.9$, $P = 0.07$). This indicates that odour is as effective as taste for long-term retention of an aversion. Moreover, the strength of the aversion obtained 36 days after acquisition is in the range of that obtained 2 days after acquisition (Fig. 2A).

The IC is necessary for CTA, but not COA, memory formation

We first assessed the effect of reversible IC inactivation during COA and CTA acquisition. There was no difference between the four

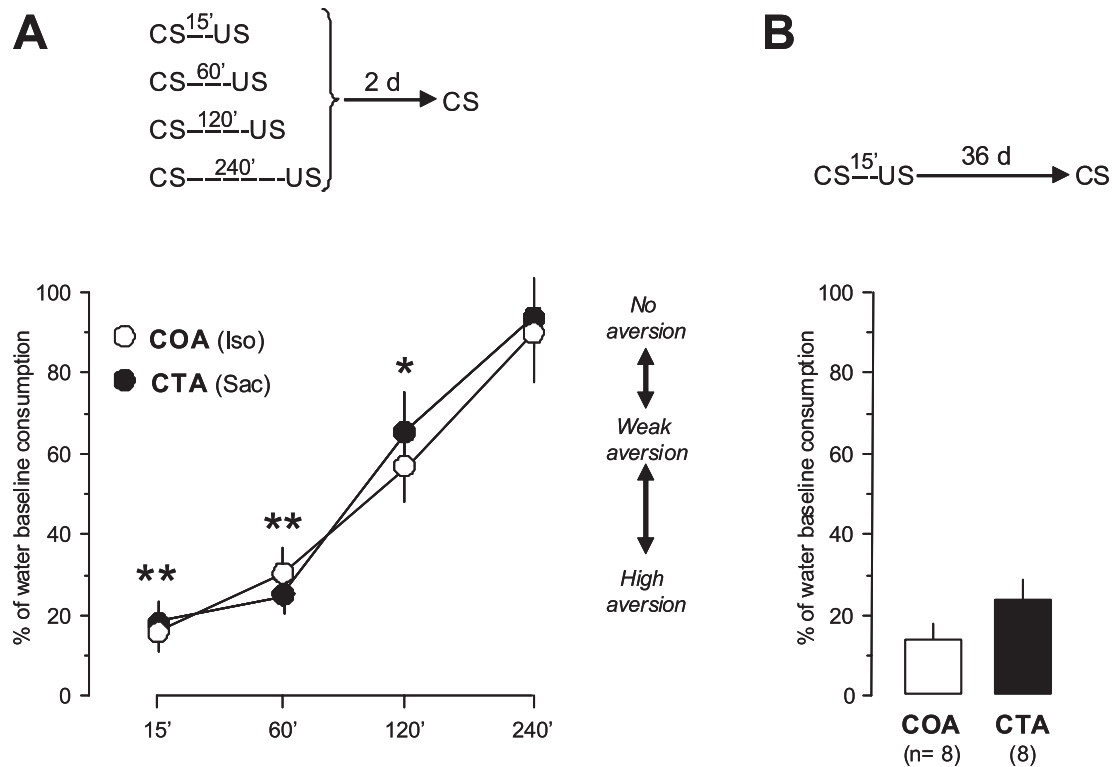


FIG. 2. Conditioned odour aversion (COA) presents similar associative characteristics as conditioned taste aversion (CTA). (A) Schematic of the behavioural procedure used with the data presented below. Aversion depends on the conditioned stimulus (CS)–unconditioned stimulus (US) delay during acquisition but not on the chemosensory cues. During acquisition, banana-odorized water (Iso) or sweet water (Sac) was paired with illness after different delays: 15, 60, 120 or 240 min. Tests were performed 2 days after CS–US pairing. (B) COA and CTA are long-lasting. Two groups were conditioned with either Iso or Sac with a 15-min CS–US delay. They were tested 36 days after acquisition. The lower is the percentage of CS intake with respect to water baseline intake, the higher is the aversion strength. ** $P < 0.001$: different from both 120- and 240-min groups. * $P < 0.05$: different from 240-min group.

groups during the days of water baseline ($F_{3,40} = 2.8$, $P > 0.1$; mean water intake: 14.5 ± 0.3 mL). On the day of acquisition, all rats drank at least 8 of the 10 mL of either the odour, Iso, or the taste, Sac, proposed ($F_{3,40} < 1$). During the next day, all groups reestablished water baseline intake (paired t -test, $t_{43} \leq 1$). Figure 3B shows the percentage of Iso or Sac intake during the test with respect to water baseline intake. Aversion was acquired differentially by the groups, depending on the CS and the treatment. All the rats showed a clear aversion as indicated by a CS intake $\leq 50\%$ of water baseline consumption, except the group injected with Lido and conditioned with Sac. A two-way ANOVA revealed a significant effect of the CS ($F_{1,40} = 26.9$; $P < 0.001$), the treatment ($F_{1,40} = 13.2$; $P < 0.001$) and the interaction between these two variables ($F_{1,40} = 4.9$; $P < 0.05$). *Post hoc* tests revealed no difference in aversion strength between Lido and Sal groups conditioned with Iso ($P > 0.1$), whereas a significantly lower aversion was present in the Lido group compared with the Sal group in animals conditioned with Sac ($P < 0.001$). Moreover, the Sal group conditioned with Sac showed a lower aversion compared with the Sal group conditioned with Iso ($P = 0.04$), suggesting that only injection of Sal into the IC is able to affect CTA.

We also assessed in other rats that Lido infusion before acquisition did not affect COA when it is infused in deeper layers of IC (unpaired t -test, $t_{16} < 1$; Fig. 3C, left). We also controlled that IC inactivation before acquisition did not affect COA when another odour is used, i.e. almond-scented water ($t_{17} < 1$; Fig. 3C, right). It must be mentioned that Sal groups conditioned with banana odour showed a higher COA than those conditioned with almond odour (Fig. 3B and C; unpaired

t -test, $t_{20} = 2.4$, $P = 0.02$) as we have recently reported in intact animals (Sevelinges *et al.*, 2008).

Finally, there was no effect on COA when Lido was infused in the IC immediately after the odour CS ($t_{16} = 1.1$; Lido: $40.1 \pm 7.0\%$; Sal: $38.9 \pm 5.3\%$), indicating that the IC is not involved in the short-term maintenance of the odour. Altogether these results indicate that neural activity in the IC is not required for COA acquisition whereas it is necessary for CTA acquisition.

Another step crucial for the memory formation is the consolidation process, which requires protein synthesis (for reviews, see Davis & Squire, 1984; Dudai, 2004; Alberini, 2008). Thus, we evaluated the effect of IC infusion of Ani, a protein synthesis inhibitor, on COA and CTA establishment. During the days of water baseline, there was a difference between groups ($F_{3,32} = 9.9$; $P < 0.001$). The water baseline consumption was higher in Iso groups (mean water intake: 17.3 ± 0.5 mL) than in Sac groups (mean water intake: 13.8 ± 0.6 mL), presumably because COA and CTA experiments were performed separately. However, the aversion is expressed as percentage of water baseline, which minimizes this difference. On the acquisition day, rats drank at least 8 of the 10 mL of either Iso or Sac proposed ($F_{3,32} < 1$). During the next day, all groups reestablished water baseline intake (paired t -test, $t_{35} \leq 1$). Figure 3D shows the percentage of Iso or Sac intake during the test with respect to water baseline intake. As previously, the aversion was acquired differentially by the groups depending on the CS and the treatment used during the conditioning. A two-way ANOVA revealed significant effects of the stimulus used ($F_{1,32} = 9.9$; $P < 0.01$) and of the treatment ($F_{1,32} = 7.4$; $P = 0.01$), but no effect of interaction ($F_{1,32} = 2.1$, $P > 0.1$). There was no effect of

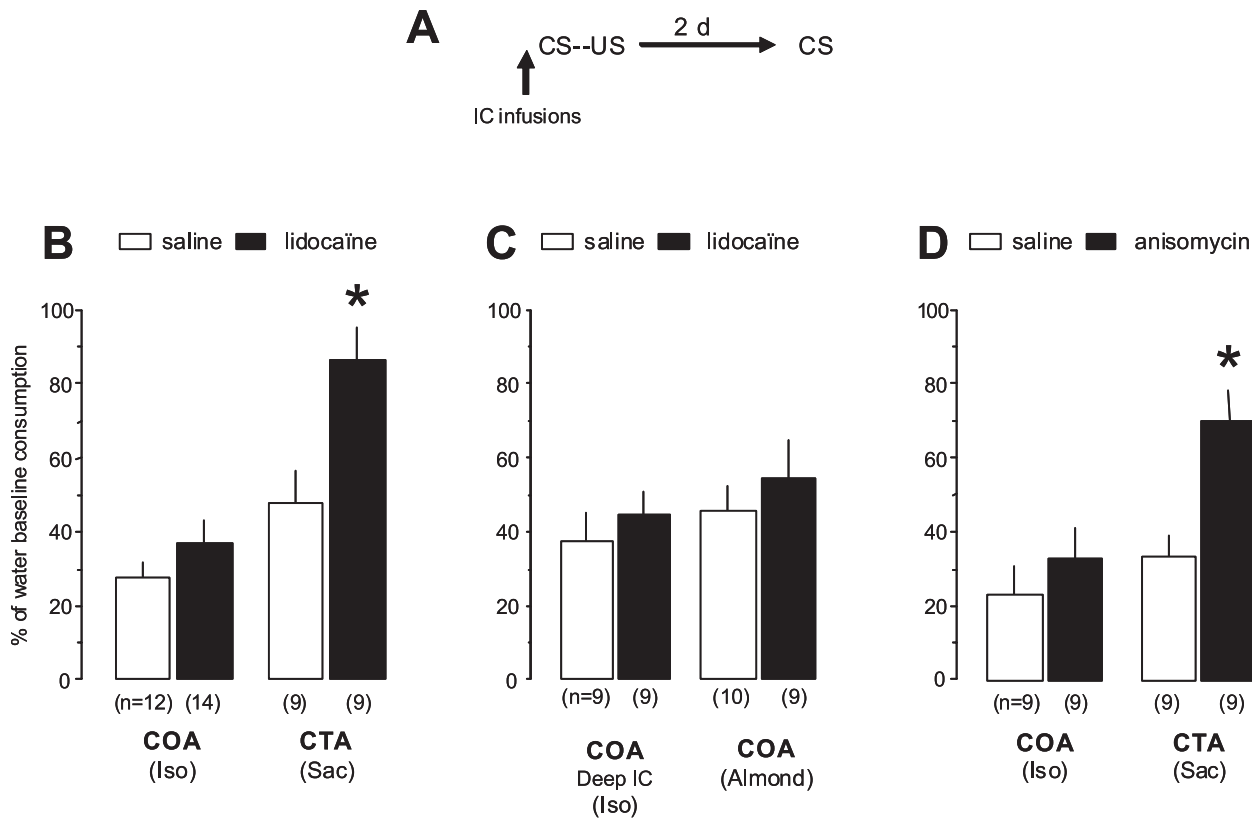


FIG. 3. Inactivation and blockade of protein synthesis in the insular cortex (IC) prevented the acquisition and consolidation of conditioned taste aversion (CTA), but not of conditioned odour aversion (COA). (A) Schematic of the behavioural procedure used. (B) Animals were infused bilaterally in the IC with saline (Sal, 0.5 $\mu\text{L}/\text{side}$) or the sodium channels blocker lidocaine hydrochloride (Lido, 4%, 0.5 $\mu\text{L}/\text{side}$) immediately before banana odour–illness or taste–illness pairing. (C) Animals were infused with Sal or Lido (left) 1 mm deeper in the IC immediately before banana odour–illness pairing or (right) before almond odour–illness pairing. (D) Animals were infused bilaterally in the IC with Sal (1 $\mu\text{L}/\text{side}$) or the protein synthesis inhibitor anisomycin (Ani, 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{side}$), 25 min before banana odour–illness or taste–illness pairing. The tests were performed 2 days after conditioned stimulus (CS)–unconditioned stimulus (US) pairing. The lower is the percentage of CS intake with respect to water baseline intake, the higher is the aversion strength. Both drugs impaired CTA but did not affect COA whatever the inactivated region of the IC or the odour–CS used. * $P < 0.05$: difference between groups.

Ani infusion in IC on COA memory ($P > 0.1$), whereas similar Ani infusion greatly impaired CTA in comparison to Sal infusion ($P < 0.01$). Sal groups conditioned with Sac or Iso did not differ ($P \geq 0.1$). These results indicate that protein synthesis in the IC is critical for CTA consolidation whereas it is not necessary for COA memory formation.

In order to evaluate whether injection of Sal into the IC could affect COA or CTA, intact animals of the first experiment were compared with Sal groups. There was no significant difference in aversion strength between intact and Sal groups tested with the banana odour (Figs 2A and 3B–D; $F_{3,32} = 1.6$, $P = 0.2$), but a significant difference between those tested with taste (Figs 2A, and 3B and D; $F_{2,21} = 3.6$, $P = 0.04$). The intact group showed a higher aversion compared with one Sal group (Fig. 3B; $P = 0.01$) but not with the other (Fig. 3D; $P = 0.1$), suggesting that in some circumstances surgery and Sal injection into the IC are able to affect CTA.

The IC is essential for the retrieval of recent and remote CTA, but not COA, memory

Some cortical structures are essential for the retrieval of remote, but not recent, memory (for review, see Frankland & Bontempi, 2004). We thus assessed the potential role of IC neural activity in the retrieval of recent and remote COA memory by inactivating the IC before a retrieval test performed either 2 days (recent memory) or 36 days

(remote memory) after acquisition. Similar treatments were realized with animals conditioned with Sac to compare the involvement of IC in the retrieval of recent and remote CTA memory.

We first assessed the effect of reversible IC inactivation before recent COA and CTA retrieval. There was no difference between the four groups during the days of water baseline ($F_{3,51} = 1.3$, $P > 0.1$; mean water intake: 15.2 ± 0.3 mL). On the day of acquisition, all rats drank at least 9 of the 10 mL of either Iso or Sac proposed ($F_{3,51} < 1$). During the next day, all groups reestablished water baseline intake (paired t -test, $t_{54} \leq 1$). Figure 4A shows the percentage of Iso or Sac intake during the test performed 2 days after acquisition with respect to water baseline intake. The aversion was acquired differentially by the groups depending on the CS and the treatment used during the retrieval test. A two-way ANOVA revealed neither effect of the CS ($F_{1,51} = 1.7$; $P > 0.1$) nor of the treatment ($F_{1,51} = 2.6$; $P = 0.1$), but a significant interaction between these variables ($F_{1,51} = 4.3$; $P < 0.05$). *Post hoc* tests revealed no difference in odour aversion between Lido and Sal groups ($P > 0.1$), whereas a significantly lower taste aversion appeared in the Lido group compared with the Sal group ($P < 0.05$). Sal groups conditioned with Sac or Iso did not differ ($P \geq 0.1$). This indicates that IC is essential for the retrieval of recent CTA memory but not recent COA memory. Moreover, Sal animals did not differ from intact animals for recent CTA or recent COA (Figs 2A and 4A; unpaired t -test, $t_{11} \leq 1$ and $t_{25} = 1.6$, respectively, $P \geq 0.1$).

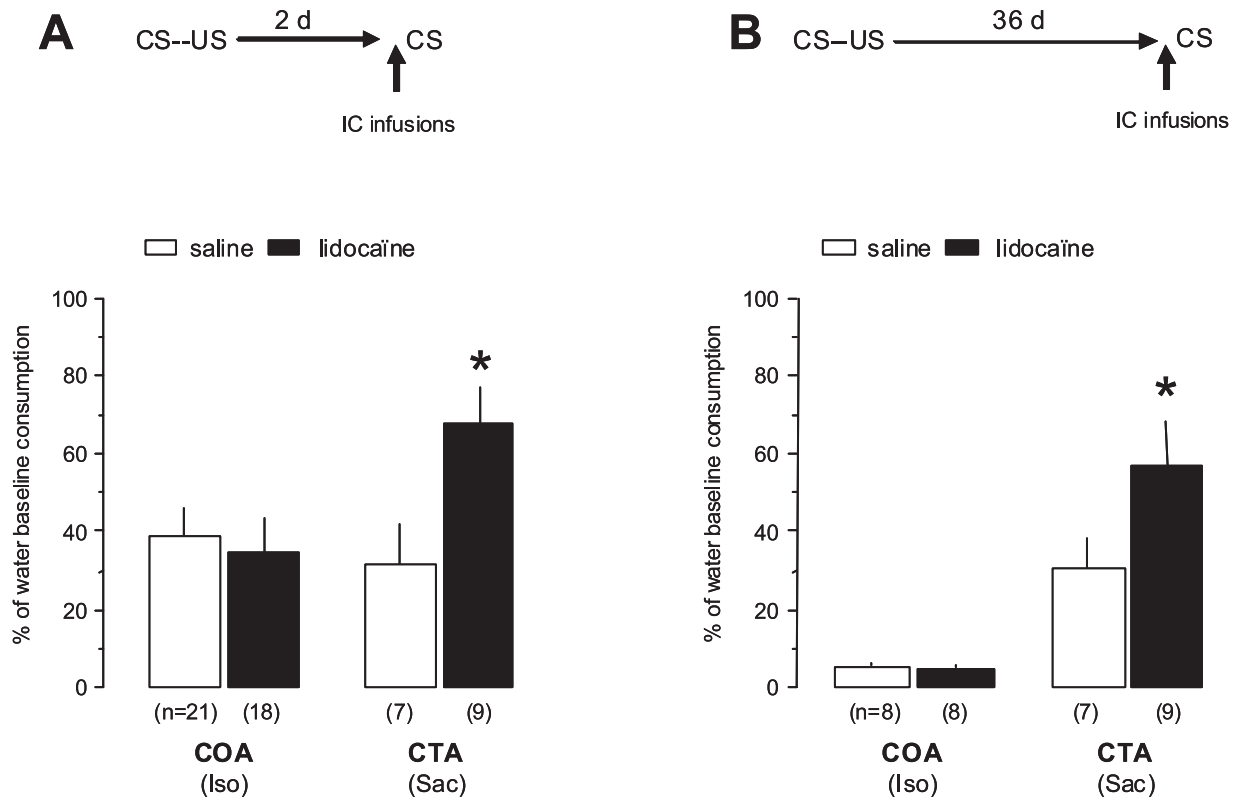


FIG. 4. Inactivation of the insular cortex (IC) impaired the memory expression of recent and remote conditioned taste aversion (CTA), but not of conditioned odour aversion (COA). (A) Schematic of the behavioural procedure used (top) with the percentage of odour or taste intake with respect to water baseline intake on recent memory test following intra-IC infusions (below). Animals were infused bilaterally in the IC with saline (Sal, 0.5 $\mu\text{L}/\text{side}$) or the sodium channels blocker lidocaine hydrochloride (Lido, 4%, 0.5 $\mu\text{L}/\text{side}$) immediately before the retrieval test performed 2 days after odour–illness or taste–illness pairing. (B) Schematic of the behavioural procedure used (top) with the percentage of CS intake with respect to water baseline intake on remote memory test following intra-IC infusions (below). Animals were infused bilaterally in the IC with Sal (0.5 $\mu\text{L}/\text{side}$) or Lido (4%, 0.5 $\mu\text{L}/\text{side}$) immediately before the retrieval test performed 36 days after odour–illness or taste–illness pairing. The lower is the percentage of CS intake with respect to water baseline intake, the higher is the aversion strength. Lido infusion in IC impaired expression of recent and remote CTA memory but did not affect COA. * $P < 0.05$: difference between groups.

We then evaluated the effect of reversible IC inactivation before remote COA and CTA retrieval. On the day of acquisition, all rats drank at least 9 of the 10 mL of either Iso or Sac proposed ($F_{3,28} = 1$). The water baseline established on the 2 days before the retrieval test was not different between the four groups ($F_{3,28} = 1.1$, $P > 0.1$; mean water intake: 14.8 ± 0.3 mL). Figure 4B shows the percentage of Iso or Sac intake during the test performed 36 days after acquisition with respect to water baseline intake. An aversion $\leq 50\%$ of water baseline for all groups except the Lido group conditioned with Sac indicated a high aversion even 36 days after acquisition. A two-way ANOVA revealed a significant effect of the CS ($F_{1,28} = 22.3$; $P < 0.001$), no effect of the treatment ($F_{1,28} = 2.6$; $P = 0.1$), and no interaction between these two variables ($F_{1,28} = 2.7$; $P = 0.1$). The Sal group conditioned with Iso showed a higher aversion compared with the Sal group conditioned with Sac ($P = 0.04$). More interestingly, Lido and Sal groups had COA of a similar strength ($P > 0.1$), whereas Lido infusion in IC impaired CTA in comparison to Sal infusion ($P < 0.05$). This indicates that IC is necessary for the retrieval of remote CTA memory but not remote COA memory. Moreover, Sal and intact groups did not differ for remote CTA (Figs 2B and 4B; unpaired t -test, $t_{13} \leq 1$), but surprisingly they differed for remote COA ($t_{14} = 2.3$, $P = 0.04$).

Discussion

The results of the present study demonstrate, using classical conditioning in the home cage, that ingested odour is as effective as taste for

single-trial learning with long CS–illness intervals. Moreover, similar to CTA, COA was perfectly retained for more than 5 weeks. Secondly, we showed that the IC, a possible site for the integration of chemosensory informations with toxicosis, is differentially involved in COA and CTA memory formation and retrieval. Disruption of IC functioning greatly impaired CTA memory whereas it left COA memory intact.

Ingested odour (inducing both orthonasal and retronasal stimulations) has the same properties as taste when associated with a visceral malaise: (i) COA requires only one pairing; (ii) COA resists a CS–US delay up to 2 h; (iii) COA does not generalize to taste (and CTA does not generalize to odour; see also Bermudez-Rattoni *et al.*, 1986); and (iv) COA is long-lasting, with strong aversion 36 days after conditioning. Moreover, COA seems to be stronger than CTA, especially during remote memory tests (see Figs 2B, 3B and 4B). It could be related to the fact that, contrary to taste, aqueous odour can be detected at a distance enhancing avoidance behaviours toward CS (see Chapuis *et al.*, 2007a,b). These results obtained using classical conditioning with free access to the odorized water in the home cage confirmed and extended similar findings obtained with rats conditioned in experimental chambers outside the home cage using more operant/instrumental conditioning (Slotnick *et al.*, 1997; Chapuis *et al.*, 2007a). Dynamics of COA and CTA establishment are similar to previous studies using the same CS and US concentration for COA (Chapuis *et al.*, 2007a,b) and CTA (Slotnick *et al.*, 1997). Interestingly, for both conditioning, increasing the CS concentration (Iso 0.1%; Sac 0.5%) allows the use of longer CS–US intervals for COA (Slotnick *et al.*,

1997) and CTA (Gutierrez *et al.*, 2003) formation. Altogether these studies highlight the importance of the retronasal olfactory stimulations induced by odour in the mouth as a key factor for inducing reliable COA. Contrary to previous claims (Garcia *et al.*, 1985), these studies suggest that taste does not constitute the only critical CS for aversion learning. Instead, intrinsic attributes of the ingested solution, either odour or taste, are similarly effective cues for illness. This model of COA, by its robustness and simplicity, is well-suited to investigate the neural basis of COA, especially using pharmacological approaches, and to compare them with CTA in order to extend our knowledge of the neurobiology of flavour aversion learning.

The next part of the present study indicates that the IC is necessary for the different memory phases of CTA, i.e. acquisition, consolidation and retrieval. These results corroborate previous findings and show that transient inactivation of the IC impaired CTA acquisition and retrieval (Gallo *et al.*, 1992; Berman *et al.*, 2000), and that blockade of protein synthesis in IC prevented CTA consolidation (Rosenblum *et al.*, 1993; Berman & Dudai, 2001; Berman *et al.*, 2003). However, to our knowledge, our study is the first to demonstrate that IC inactivation impaired the retrieval of 5-weeks-old CTA memory, as it did for 2-day-old memory. This is congruent with the idea that the IC represents a long-term storage site for CTA (Shema *et al.*, 2007). Of interest is a recent report showing that the anterior cingulate cortex is required for the expression of CTA tested 1 month but not 1 day after conditioning (Ding *et al.*, 2008). These data suggest that as CTA memory matures, it becomes additionally dependent on cortical structures other than the IC. This indicates that the neural network sustaining CTA memory is not fixed after acquisition but evolves with time, even without explicit reactivation.

We also demonstrated that disruption of normal IC functioning during acquisition, consolidation or retrieval phase left COA memory intact. These results are consistent with previous findings showing that permanent IC lesion did not affect COA learning or retention (Kiefer *et al.*, 1982, 1984; Lasiter *et al.*, 1985; Roman *et al.*, 2006). Our results suggest that the absence of effect in previous lesion studies was not related to some functional recoveries and/or reorganizations after permanent IC lesion. However, some technical problems could explain that our IC manipulations did not affect COA memory. First, it is possible that the part of the IC involved in the integration of odour with toxicosis was not reached by our drug infusions. This seems unlikely because the coordinates of the cannulae placement were chosen according to previous electrophysiological studies demonstrating olfactory responses to this antero-posterior level in the IC (Sewards & Sewards, 2001; Chapuis *et al.*, 2007b). Moreover, neither the dorsal nor the ventral infusion had an effect on COA memory, suggesting that the absence of effect was not due to the lack of drug diffusion in a particular layer of the IC. Second, the dose of drugs and the time of injection would not be adequate. However, they were appropriate to impair CTA indicating the reliability of our infusion procedure. Third, the banana solution we used is a particular odorant that does not activate the IC whereas other odours do. However, this odour induced electrophysiological responses in the IC (Chapuis *et al.*, 2007b). Moreover, COA to another odour (almond) was not affected by IC inactivation, indicating that the absence of effect is not specific to one odorant. Altogether these results go against the necessity of IC for acquisition, consolidation and retrieval of COA memory. If something, IC manipulations would enhance COA instead of impairing it, as cannulated animals showed stronger remote COA than intact animals.

The findings of the present study seem at odds with a recent study showing that temporary inactivation of the IC impaired an olfactory-based learning task, the social transmission of food preferences (Fortis-Santiago *et al.*, 2008). However, if both tasks deal with olfactory stimuli, they rely on different olfactory stimulation, only

orthonasal in social transmission vs. essentially retronasal in COA, and they involve very different associative learning processes, odour–odour vs. odour–toxicosis, resulting in memory with different hedonic values, preference vs. aversion. All these discrepancies could explain that these tasks rely on different neural substrates, like the IC (for review, see Petrulis & Eichenbaum, 2003). Our recent electrophysiological results showed that the IC is part of a distributed neural network specifically activated by COA, including the olfactory bulb, the anterior and posterior piriform cortex, the BLA and the medial and orbital prefrontal cortex (Chapuis *et al.*, 2007b). It is thus conceivable that the neural activity in other structures of the network is able to sustain COA memory formation and retrieval when the IC is not functional. Among these structures, the BLA and the piriform are well positioned for assuming this role. Indeed, lesion and pharmacological studies demonstrated that the BLA is critical for the different steps of COA memory (Bermudez-Rattoni *et al.*, 1983, 1986; Ferry *et al.*, 1996; Miranda *et al.*, 2007; Desgranges *et al.*, 2008; Sevelinges *et al.*, 2008, 2009). The importance of the piriform cortex was not directly evaluated in COA, but recent findings indicate that this structure, and especially its posterior part, does not represent a simple unimodal olfactory cortex but a more integrative and associative area. In particular, in rats and humans, olfactory aversive learning induces piriform plasticity specific to the associative process rather than to the odour exposure (Gottfried *et al.*, 2002; Sevelinges *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Moreover, it must be mentioned that the orbitofrontal cortex, another important structure for odour integration (Rolls *et al.*, 1996; Schoenbaum *et al.*, 1999), is not necessary for COA, as transient inactivation of this area did affect neither acquisition nor retrieval of COA (Desgranges & Ferreira, unpublished observation).

We recently demonstrated using a pharmacological approach that the BLA is necessary for acquisition, consolidation and retrieval of COA memory (Desgranges *et al.*, 2008; Sevelinges *et al.*, 2008, 2009). We also showed that pre-CS blockade of beta-adrenergic receptors in BLA impaired COA acquisition but not CTA acquisition (Miranda *et al.*, 2007, 2008). This indicates a double dissociation concerning the structures and mechanisms involved in flavour aversion learning depending on the chemosensory characteristics of the ingested solution: the IC is necessary for CTA memory but not for COA whereas the BLA seems more critical for COA memory than for CTA. Our results also extend recent works on flavour preference learning showing that amygdala lesion prevented nutrient-conditioned odour preference (Touzani & Sclafani, 2005), whereas IC lesion was without effect (Touzani & Sclafani, 2007). This suggests a more important role for the BLA than for IC in associative learning between olfactory and viscerosensory informations, either negative (toxicosis) or positive (nutrients).

Acknowledgements

This work was supported by AROMALIM Grant Agence National de la Recherche ANR-05-PNRA-002. We thank Nicole Jouanneau, Chantal Moussu, Juliette Coggié and Fabien Cornilleau for technical assistance, Claude Cahier and Jean-Claude Braguer for the care they provided to the animals during the experiments, and Claire Dawson for the English revision of the final text. Bertrand Desgranges was supported by a PhD grant from INRA-Région Centre. Yannick Sevelinges was supported by a post-doc grant from ANR-05-PNRA-002.

Abbreviations

Ani, anisomycin; BLA, basolateral amygdala; COA, conditioned odour aversion; CS, conditioned stimulus; CTA, conditioned taste aversion; IC, insular cortex; Iso, isoamyl acetate; Lido, lidocaine hydrochloride; Sac, saccharin; Sal, saline; US, unconditioned stimulus.

References

- Alberini, C.M. (2008) The role of protein synthesis during the labile phases of memory: revisiting the skepticism. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **89**, 234–246.
- Berman, D.E. & Dudai, Y. (2001) Memory extinction, learning anew, and learning the new: dissociations in the molecular machinery of learning in cortex. *Science*, **291**, 2417–2419.
- Berman, D.E., Hazvi, S., Neduva, V. & Dudai, Y. (2000) The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J. Neurosci.*, **20**, 7017–7023.
- Berman, D.E., Hazvi, S., Stehberg, J., Bahar, A. & Dudai, Y. (2003) Conflicting processes in the extinction of conditioned taste aversion: behavioral and molecular aspects of latency, apparent stagnation, and spontaneous recovery. *Learn. Mem.*, **10**, 16–25.
- Bermudez-Rattoni, F. (2004) Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 209–217.
- Bermudez-Rattoni, F., Rusiniak, K.W. & Garcia, J. (1983) Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste is disrupted by application of novocaine into amygdala. *Behav. Neural Biol.*, **37**, 61–75.
- Bermudez-Rattoni, F., Grijalva, C.V., Kiefer, S.W. & Garcia, J. (1986) Flavor-illness aversions: the role of the amygdala in the acquisition of taste-potentiated odor aversions. *Physiol. Behav.*, **38**, 503–508.
- Boehnke, S.E. & Rasmusson, D.D. (2001) Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex. *J. Neurosci. Methods*, **105**, 133–141.
- Chapuis, J., Messaoudi, B., Ferreira, G. & Ravel, N. (2007a) Importance of retronasal and orthonasal olfaction for odor aversion memory in rats. *Behav. Neurosci.*, **121**, 1383–1392.
- Chapuis, J., Messaoudi, B., Ferreira, G., Gervais, R. & Ravel, N. (2007b) *Different Neural Networks Involved in Conditioned Odor Aversion Learning According to Orthonasal and Retronasal Odor Presentations*. Program n 919.8. 2007 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Society for Neuroscience, San Diego, CA. Online.
- Davis, H.P. & Squire, L.R. (1984) Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.*, **96**, 518–559.
- Desgranges, B., Levy, F. & Ferreira, G. (2008) Anisomycin infusion in amygdala impairs consolidation of odor aversion memory. *Brain Res.*, **1236**, 166–175.
- Ding, H.K., Teixeira, C.M. & Frankland, P.W. (2008) Inactivation of the anterior cingulate cortex blocks expression of remote, but not recent, conditioned taste aversion memory. *Learn. Mem.*, **15**, 290–293.
- Dudai, Y. (2004) The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.*, **55**, 51–86.
- Ferry, B., Oberling, P., Jarrard, L.E. & Di Scala, G. (1996) Facilitation of conditioned odor aversion by entorhinal cortex lesions in the rat. *Behav. Neurosci.*, **110**, 443–450.
- Fortis-Santiago, Y., Rodwin, B. & Katz, D.B. (2008) *Olfactory Learning Requires the Taste System*. Program n 162.10. 2008 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Society for Neuroscience, Washington, DC. Online.
- Frankland, P.W. & Bontempi, B. (2005) The organization of recent and remote memories. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 119–130.
- Gallo, M., Roldan, G. & Bures, J. (1992) Differential involvement of gustatory insular cortex and amygdala in the acquisition and retrieval of conditioned taste aversion in rats. *Behav. Brain Res.*, **52**, 91–97.
- Garcia, J., Lasiter, P.S., Bermudez-Rattoni, F. & Deems, D.A. (1985) A general theory of aversion learning. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **443**, 8–21.
- Gottfried, J.A., Deichmann, R., Winston, J.S. & Dolan, R.J. (2002) Functional heterogeneity in human olfactory cortex: an event-related functional magnetic resonance imaging study. *J. Neurosci.*, **22**, 10819–10828.
- Gutierrez, R., Rodriguez-Ortiz, C.J., De La Cruz, V., Nunez-Jaramillo, L. & Bermudez-Rattoni, F. (2003) Cholinergic dependence of taste memory formation: evidence of two distinct processes. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **80**, 323–331.
- Jones, S.V., Stanek-Rattiner, L., Davis, M. & Ressler, K.J. (2007) Differential regional expression of brain-derived neurotrophic factor following olfactory fear learning. *Learn. Mem.*, **14**, 816–820.
- Kiefer, S.W., Rusiniak, K.W. & Garcia, J. (1982) Flavor-illness aversions: gustatory neocortex ablations disrupt taste but not taste-potentiated odor cues. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **96**, 540–548.
- Kiefer, S.W., Leach, L.R. & Braun, J.J. (1984) Taste agnosia following gustatory neocortex ablation: dissociation from odor and generality across taste qualities. *Behav. Neurosci.*, **98**, 590–608.
- Lasiter, P.S., Deems, D.A. & Garcia, J. (1985) Involvement of the anterior insular gustatory neocortex in taste-potentiated odor aversion learning. *Physiol. Behav.*, **34**, 71–77.
- Li, W., Howard, J.D., Parrish, T.B. & Gottfried, J.A. (2008) Aversive learning enhances perceptual and cortical discrimination of indiscriminable odor cues. *Science*, **319**, 1842–1845.
- Lomber, S.G. (1999) The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *J. Neurosci. Methods*, **86**, 109–117.
- Miranda, M.A., Ferry, B. & Ferreira, G. (2007) Basolateral amygdala noradrenergic activity is involved in the acquisition of conditioned odor aversion in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **88**, 260–263.
- Miranda, M.I., Rodriguez-Garcia, G., Reyes-Lopez, J.V., Ferry, B. & Ferreira, G. (2008) Differential effects of beta-adrenergic receptor blockade in basolateral amygdala or insular cortex on incidental and associative taste learning. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **90**, 54–61.
- Nerad, L., Ramirez-Amaya, V., Ormsby, C.E. & Bermudez-Rattoni, F. (1996) Differential effects of anterior and posterior insular cortex lesions on the acquisition of conditioned taste aversion and spatial learning. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **66**, 44–50.
- Palmerino, C.C., Rusiniak, K.W. & Garcia, J. (1980) Flavor-illness aversions: the peculiar roles of odor and taste in memory for poison. *Science*, **208**, 753–755.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th Edn, Academic Press, San Diego, CA.
- Petrulis, A. & Eichenbaum, H. (2003) Olfactory memory. In Doty, R.L. (Ed.), *Handbook of Olfaction and Gustation*. 2nd Edn, Marcel Dekker Inc, New York, Basel, pp. 409–438.
- Rolls, E.T., Critchley, H.D., Mason, R. & Wakeman, E.A. (1996) Orbitofrontal cortex neurons: role in olfactory and visual association learning. *J. Neurophysiol.*, **75**, 1970–1981.
- Roman, C., Neieridze, N., Sastre, A. & Reilly, S. (2006) Effects of lesions of the bed nucleus of the stria terminalis, lateral hypothalamus, or insular cortex on conditioned taste aversion and conditioned odor aversion. *Behav. Neurosci.*, **120**, 1257–1267.
- Rosenblum, K., Meiri, N. & Dudai, Y. (1993) Taste memory: the role of protein synthesis in gustatory cortex. *Behav. Neural Biol.*, **59**, 49–56.
- Rusiniak, K.W., Hankins, W.G., Garcia, J. & Brett, L.P. (1979) Flavor-illness aversions: potentiation of odor by taste in rats. *Behav. Neural Biol.*, **25**, 1–17.
- Schoenbaum, G., Chiba, A.A. & Gallagher, M. (1999) Neural encoding in orbitofrontal cortex and basolateral amygdala during olfactory discrimination learning. *J. Neurosci.*, **19**, 1876–1884.
- Sevelinges, Y., Gervais, R., Messaoudi, B., Granjon, L. & Mouly, A.M. (2004) Olfactory fear conditioning induces field potential potentiation in rat olfactory cortex and amygdala. *Learn. Mem.*, **11**, 761–769.
- Sevelinges, Y., Levy, F., Mouly, A.M. & Ferreira, G. (2008) Rearing with artificially-scented mothers attenuates conditioned odor aversion in adulthood but not its amygdala dependency. *Behav. Brain Res.* doi:10.1016/j.bbr.2008.11.003.
- Sevelinges, Y., Desgranges, B. & Ferreira, G. (2009) The basolateral amygdala is necessary for the encoding and the expression of odor memory. *Learn. Mem.* (in press).
- Sewards, T.V. & Sewards, M.A. (2001) Cortical association areas in the gustatory system. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **25**, 395–407.
- Shema, R., Sacktor, T.C. & Dudai, Y. (2007) Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science*, **317**, 951–953.
- Slotnick, B.M., Westbrook, F. & Darling, F.M.C. (1997) What the rat's nose tells the rat's mouth: long delay aversion conditioning with aqueous and potentiation of taste by odors. *Anim. Learn. Behav.*, **25**, 357–369.
- Tehovnik, E.J. & Sommer, M.A. (1997) Effective spread and timecourse of neural inactivation caused by lidocaine injection in monkey cerebral cortex. *J. Neurosci. Methods*, **74**, 17–26.
- Touzani, K. & Sclafani, A. (2005) Critical role of amygdala in flavor but not taste preference learning in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 1767–1774.
- Touzani, K. & Sclafani, A. (2007) Insular cortex lesions fail to block flavor and taste preference learning in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **26**, 1692–1700.

The basolateral amygdala is necessary for the encoding and the expression of odor memory

Yannick Sevelinges, Bertrand Desgranges, and Guillaume Ferreira¹

Laboratoire de Comportement, Neurobiologie et Adaptation, CNRS UMR6175, INRA UMR85, Université Tours, F-37380 Nouzilly, France

AU1 Conditioned odor avoidance (COA) results from the association between a novel odor and a delayed visceral illness. The present experiments investigated the role of the basolateral amygdala (BLA) in acquisition and retrieval of COA memory. To address this, we used the GABA_A agonist muscimol to temporarily inactivate the BLA during COA acquisition or expression. BLA inactivation before odor–malaise pairing greatly impaired COA tested 3 d later. In contrast, muscimol microinfusion between odor and malaise spared retention. Moreover, inactivation of the BLA before pre-exposure to the odor prevented latent inhibition of COA. This suggests that neural activity in the BLA is essential for the formation of odor representation. BLA inactivation before the retrieval test also blocked COA memory expression when performed either 3 d (recent memory) or 28 d (remote memory) after acquisition. This effect was transitory as muscimol-treated animals were not different from controls during the subsequent extinction tests. Moreover, muscimol infusion in the BLA neither affected olfactory perception nor avoidance behavior, and it did not induce a state-dependent learning. Altogether, these findings suggest that neural activity in the BLA is required for the encoding and the retrieval of odor memory. Moreover, the BLA seems to play a permanent role in the expression of COA.

Considerable evidence indicates that the amygdala, and more particularly, the basolateral nucleus of the amygdala (BLA), is necessary for aversive and emotional memories in rats and humans (for reviews, see McGaugh 2004; Phelps and LeDoux 2005). Numerous studies suggest that the BLA is involved in the formation of affective memory, but whether the amygdala stores such memory is controversial. Results of studies using fear conditioning support the view that essential aspects of learning take place in the BLA, which subserves long-term storage of fear memory (for review, see Phelps and LeDoux 2005). In particular, lesion studies showed that the BLA has a permanent role in the expression of learned fear (Maren et al. 1996; Gale et al. 2004). On the other hand, it has been suggested for inhibitory avoidance that the BLA is not the site of memory storage, but rather a region that is only temporarily required after training (for review, see McGaugh 2004). Consistent with this idea, the BLA is important for recent (1 d) but not for remote (>10 d) memory retrieval of inhibitory avoidance (Liang et al. 1982, 1996; Izquierdo et al. 1997).

The importance of BLA has also been investigated in conditioned taste avoidance (CTA) and conditioned odor avoidance (COA), in which animals learn to avoid a taste or an odor, respectively (the conditioned stimulus, CS), previously paired with a visceral malaise (the unconditioned stimulus, US) (for reviews, see Garcia et al. 1985; Bures 1998; Batsell and Blankenship 2002). Taste was long considered the critical CS for food avoidance in comparison to odor (Palmerino et al. 1980; Garcia et al. 1985). However, it has been demonstrated more recently that when odor is mixed with water (inducing primarily retronasal detection), instead of being delivered close to the solution (inducing only orthonasal detection), odor is as effective as taste for illness: It requires a single trial, resists a CS–US delay of several hours, and can be recalled several weeks after acquisition (Slotnick et al. 1997; Chapuis et al. 2007a). Lesion or pharmacological manipulation of the BLA impaired CTA acquisition and recent memory retrieval

(Gallo et al. 1992; Yamamoto et al. 1995; Morris et al. 1999; Yasoshima et al. 2000), despite the exact role of amygdala in CTA, which still remains to be solved (for reviews, see Lamprecht and Dudai 2000; Reilly and Bornovalova 2005). Concerning COA, lesion or reversible inactivation of the entire amygdala before COA impaired acquisition (Bermudez-Rattoni et al. 1983, 1986), while pharmacological stimulation of the BLA immediately after the CS presentation enhanced the COA acquisition (Ferry and Di Scala 1997). These results were based on orthonasal perception (odor on a disc), and it has to be evaluated whether similar findings can be obtained with COA based on retronasal perception (ingested odor). Moreover, these studies point to the importance of the BLA in COA memory formation; however, no evidence to date allows us to differentiate the role of the BLA in the different mnemonic phases, i.e., CS processing, US processing, or CS–US association. It remains to be established whether post-CS inactivation induced similar COA impairment as pre-CS inactivation and whether BLA neural activity is also necessary for the encoding of a nonassociative odor memory. Furthermore, it has to be elucidated whether the BLA is essential for retrieval of recent and remote COA memory in order to evaluate whether this area plays a temporary or permanent role in the expression of COA.

For this purpose, we first evaluated the effect of temporary inactivation of the BLA on acquisition of COA (based on ingested odor) by local infusions of the GABA_A agonist muscimol (Mus) either before odor–malaise pairing (pre-CS) or between odor and malaise (post-CS). To further investigate the role of the BLA in the encoding of odor memory, the BLA was inactivated before exposure to ingested odor in an incidental learning. Finally, we assessed the effect of BLA inactivation on the retrieval of recent (3 d) and remote (28 d) COA memory.

Results

Inactivation of the BLA blocks the acquisition of new odor memory

We first evaluated in which stage of COA acquisition the BLA is involved. For this purpose, rats were implanted with bilateral

¹Corresponding author.
E-mail ferreira@tours.inra.fr; fax 33-2-47-42-77-43.
Article is online at <http://www.learnmem.org/cgi/doi/10.1101/lm.1247609>.

ERROR: undefinedresource
OFFENDING COMMAND: findresource

STACK:

/0
/CSA
/0
/CSA
-mark-