

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Laboratoire des Neurosciences Cognitives et Adaptatives**

**THÈSE présentée par :**

**Yasmine BRIK**

soutenue le: 5 décembre 2024

pour obtenir le grade de :

**Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/Spécialité: Neurosciences

**Conséquences comportementales et émotionnelles à court et long terme de la séparation maternelle néonatale chez le rat**

**THÈSE dirigée par:**  
POISBEAU Pierrick

Professeur, Université de Strasbourg, LNCA, CNRS, UMR 7364

**THÈSE encadrée par:**  
MELCHIOR Meggane

Maître de Conférences, Université de Strasbourg, LNCA, CNRS, UMR 7364

**RAPPORTEURS :**

SHROEDER Henri Professeur, Université de Lorraine, Inserm, UMRS 1256 N-GERE

MOREAU Nathan Professeur, Université de Paris Cité, UFR d'Odontologie, EA 7543

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

PEREIRA DE VASCONCELOS Anne Chargée de recherche, Université de Strasbourg, LNCA, CNRS, UMR 7364

GROVA Nathalie Professeure associée, Université de Lorraine, Inserm, UMRS 1256 N-GERE

# Avertissement au lecteur / Warning to the reader

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition des membres de la communauté universitaire. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Cela implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction ou représentation illicite encourt une poursuite pénale.

This document is the result of a long process approved by the jury and made available to members of the university community. It is subject to the intellectual property rights of its author. This implies an obligation to quote and reference when using this document. Furthermore, any infringement, plagiarism, unlawful reproduction or representation will be prosecuted.

## Code de la Propriété Intellectuelle

### Article L122-4 :

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite. Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction par un art ou un procédé quelconque.

Any representation or reproduction in whole or in part without the consent of the author or his successors in title or assigns is unlawful. The same applies to translation, adaptation or transformation, arrangement or reproduction by any art or process whatsoever.

Articles L335-1 à L335-9. : Dispositions pénales / Penal provisions.

## Licence attribuée par l'auteur



<https://creativecommons.org/licenses/?lang=fr-FR>

## Conséquences comportementales et émotionnelles à court et long terme de la séparation maternelle néonatale chez le rat

### Résumé

L'adversité précoce, incluant divers stress périnataux et infantiles, peut affecter le développement cérébral de l'enfant et sa santé à long-terme en raison de son impact durant une période critique de plasticité cérébrale. Au cours de cette thèse, l'impact de ce stress précoce a été examiné via un modèle de séparation maternelle néonatale (SMN) chez le rat. Ce travail adopte une approche longitudinale et centrée sur la douleur en évaluant le neurodéveloppement en début de vie, puis la contagion émotionnelle à la douleur (un aspect de l'empathie) et le développement de neuropathies à l'âge adulte. Nous avons pu démontrer que la SMN n'affecte pas les fonctions sensorimotrices essentielles à la survie, mais altère durablement des fonctions comme la nociception. La contagion émotionnelle à la douleur a été altérée, avec des comportements prosociaux réduits. Concernant la neuropathie, les rats SMN ont montré une hypersensibilité retardée et moins marquée que les témoins, résultat inattendu. Notre étude montre que certaines fonctions résistent au stress néonatal, tandis que la nociception et les comportements sociaux sont durablement affectés.

**Mots clés :** stress précoce, neurodéveloppement, nociception, contagion émotionnelle, neuropathie.

### Abstract

Adverse childhood experiences, including various perinatal and infantile stresses, can affect a child's brain development and long-term health through its impact during a critical period of brain plasticity. In this thesis, the impact of this early stress was examined using a neonatal maternal separation (NMS) model in rats. This work takes a longitudinal, pain-focused approach, assessing neurodevelopment in early life, followed by emotional contagion to pain (an aspect of empathy) and the development of neuropathies in adulthood. We were able to demonstrate that neonatal stress does not affect the motor functions essential for survival, but durably alters functions such as nociception. Emotional contagion to pain was impaired, with reduced prosocial behaviors. Regarding neuropathy, NMS rats showed a delayed and a less intense hypersensitivity compared to controls, revealing unexpected results. Our study demonstrates that some functions are resistant to neonatal stress, while nociception and social behaviors are durably affected.

**Keywords:** early-life stress, neurodevelopment, nociception, emotional contagion, neuropathy.



## Remerciements

Je tenais par commencer en remerciant les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail : Pr Shroeder Henri, Pr Moreau Nathan, Pr associée Grova Nathalie et Dr Pereira De Vasconcelos Anne.

Avant de m'épancher sur les prochaines lignes, il convient de remercier ceux qui ont rendu ce travail de thèse possible : Meggane et Pierrick. On n'aurait pu rêver mieux comme encadrants de thèse. Alors merci pour votre pédagogie, soutien et bienveillance. Ces dernières années au sein de l'équipe ont été enrichissantes aussi scientifiquement qu'humainement. Merci à tous les membres de notre équipe pour leur aide, soutien et partage. Merci à Clémence (the G.O.A.T.) pour m'avoir tant appris avec beaucoup de patience et pédagogie. Merci à Yannick pour son aide au labo et dans la vie quotidienne d'une jeune doctorante parfois maladroite.

Merci à mes amies et collègues Hannah, Edith, Apolline et Lisa peut-être les plus belles rencontres pendant cette thèse. Merci pour votre amitié, enthousiasme et compagnie du début à la fin, merci d'avoir partagé mes petites victoires et difficultés tout ce temps. Merci à tous les amis, collègues, camarades qui ont croisé mon chemin et l'ont rendu plus riche et plus joyeux.

Merci aux membres du Chronobiotron pour leur aide et conseils lors de ces nombreuses expériences, particulièrement Sophie et Dom pour leur pédagogie lors de mes débuts. Merci à Antoine pour avoir partagé avec nous ce fabuleux outil qu'est *Hourmouse* (même si c'est arrivé tard dans ma thèse, ça a été une aide des plus précieuses !).

A tout ceux qui m'ont demandé comment fait-on pour survivre pendant une thèse avec deux enfants en bas âge, je vous livre aujourd'hui mon secret. Il suffit d'avoir une très grande fratrie constituée de 5 frères et sœurs, tous situés dans la même ville que vous, prêts à faire du babysitting à n'importe quel moment de l'année gratuitement pendant 3 ans. Alors merci à mes parents, Messaouda et Ali, à mon mari Laïd, et surtout à ma fratrie Nour, Rafa, Ayah, Safa et Mohammed pour tout leur soutien, je n'y serais jamais arrivée sans votre aide. Vous êtes tous mes héros ! Merci à Madeline, l'amie de ma vie (oui oui, ça va faire 15 ans bientôt, soit la moitié de ma vie) pour m'avoir permis de prendre du recul quand il le fallait et pour m'avoir apporté du réconfort et de la joie à tout moment.

## Table des matières

Remerciements.....	2
Table des matières.....	3
Liste des figures .....	5
Liste des abréviations .....	6
Contributions scientifiques durant la thèse .....	7
Résumé de thèse .....	9
<b>I. Introduction .....</b>	<b>14</b>
A.    Chapitre 1 : Aspects neurodéveloppementaux.....	14
1.    La plasticité du système nerveux et sa vulnérabilité en début de vie .....	15
a)    Neurodéveloppement dans la période périnatale .....	15
b)    Système nociceptif du nouveau-né .....	17
2.    Impact de l'adversité précoce .....	20
a)    Réponse au stress .....	20
b)    Conséquences de l'adversité précoce chez l'Homme .....	22
3.    Modèles d'adversité précoce .....	25
4.    Conséquences de la séparation maternelle néonatale.....	26
a)    Conséquences sur la myélinisation du système nerveux .....	26
b)    Conséquences cognitives et émotionnelles .....	27
c)    Conséquences sur la sensibilité nociceptive .....	28
d)    Altérations du système nociceptif .....	31
5.    Les réflexes comme marqueurs de maturité du système nerveux .....	34
6.    Quand le petit va mal, il vocalise.....	35
a)    Vocalisations chez le raton.....	37
b)    Vocalisations chez l'adulte .....	39
c)    Substrat neurologique .....	41
B.    Chapitre 2 : L'empathie à la douleur dans un contexte d'adversité précoce .....	43
1.    L'empathie et ses différentes composantes .....	43
2.    Aires corticales et substrat neurologique associés .....	47
a)    Aires corticales associées à l'empathie à la douleur .....	47

b)	Rôle de l'ocytocine.....	48
3.	Une possible altération de l'empathie à la douleur par l'environnement néonatale	51
4.	Apport des modèles de laboratoires.....	51
a)	Modèles de tests de contagion émotionnelle .....	52
b)	Classification des comportements observables .....	55
c)	Modalités sensorielles associées et réseaux neuronaux.....	55
d)	Adversité précoce et contagion émotionnelle.....	56
C.	Chapitre 3 : Cas particulier de la douleur neuropathique .....	58
1.	Définitions .....	58
2.	L'adversité précoce, facteur de risque dans la douleur chronique.....	59
3.	Modèles de douleur neuropathique .....	60
4.	Conséquences anxiо-dépressives dans les modèles de laboratoire .....	62
<b>II.</b>	<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>65</b>
<b>III.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>68</b>
	Article 1 : Conséquences de la séparation maternelle néonatale sur le développement des fonctions sensorimotrices et la sensibilité à la douleur : Comparaison entre les souches de rat Sprague Dawley et Wistar.....	68
	Article 2 : Conséquences de la séparation maternelle néonatale sur la contagion de la douleur chez le rat Sprague Dawley .....	94
	Article 3 : Impact de la séparation maternelle néonatale sur le développement de la douleur neuropathique induite par la constriction chronique du nerf sciatique chez le rat adulte .....	113
<b>IV.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>144</b>
<b>V.</b>	<b>Revue.....</b>	<b>166</b>
<b>VI.</b>	<b>Bibliographie.....</b>	<b>175</b>

## Liste des figures

Figure 1 : Schéma résumant les grandes étapes de neurodéveloppement .....	16
Figure 2 : Profil d'expression des récepteurs à l'ocytocine dans le cerveau du rongeur à différents âges. ....	20
Figure 3 : Surcharge allostatique induite par l'accumulation de stress. ....	22
Figure 4 : Similarités des conséquences de l'adversité précoce entre plusieurs espèces .....	25
Figure 5 : Conséquences sur le système nociceptif d'une SMN.....	31
Figure 6: Résumé des facteurs induisant une variabilité dans les phénotypes des modèles d'adversité précoce chez le rongeur.....	33
Figure 7 : Exemples de tests évaluant le neurodéveloppement chez le rat.....	35
Figure 8 : Description de l'anatomie du larynx chez le rat .....	36
Figure 9 : Classification des vocalisations ultrasonores chez le rat adulte.....	41
Figure 10 : Processus cognitifs liés à l'empathie à la douleur. ....	46
Figure 11 : Différentes activations dans le cerveau lors de l'expérience de la douleur et de l'empathie à la douleur .....	48
Figure 12 : Résumé du rôle de l'ocytocine sur le cerveau social.....	50
Figure 13 : Protocole typique de la mise en place d'un test de contagion émotionnelle.....	53
Figure 14 : Différents effets de la contagion émotionnelle chez le rongeur. ....	55
Figure 15 : Illustration des différents modèles de neuropathie par compression ou lésion du nerf sciatique.....	61
Figure 16 : Schéma de l'action du système noradrénergique et des antidépresseurs sur la douleur neuropathique. ....	157
Figure 17 : Illustration conceptuelle de l'impact des traitements précoce et tardifs sur l'allodynie mécanique. ....	158
Figure 18 : Schéma des conséquences de l'adversité précoce, entre résilience et pathologie. ....	164

## Liste des abréviations

ACTH : hormone adrénocorticotrope

AD : animal démonstrateur

AO : animal observateur

CCI : chronic constriction injury

CTRL : contrôle

cPFM : cortex préfrontal médian

DOHaD : origine développementale de la santé et des maladies

HHS : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien

IASP : Association Internationale pour l'Etude de la Douleur

LBN : limited bedding and nesting

ME : moelle épinière

NA : noradrénaline

PAG : substance grise périaqueducale

Px : x<sup>ème</sup> jour postnatal

SD : Sprague Dawley

SMN : Séparation maternelle néonatale

WR : Wistar

## Contributions scientifiques durant la thèse

### ❖ Publications

- *Article de revue en français dans des journaux à comités de lecture*

**Brik Y.** et Melchior M., (2022) La question de l'empathie à la douleur et de l'impact de l'environnement néonatal. *Douleur et Analgésie*, **35**, 188-195

- *Article en préparation*

**Brik Y.**, Gazzo G, Poisbeau P., Melchior M., (2024) Consequences of neonatal maternal separation on the development of sensorimotor functions and pain sensation: A comparison between Sprague Dawley and Wistar rat.

**Brik Y.**, Poisbeau P., Melchior M., The impact of neonatal maternal separation on contagion of pain in Sprague Dawley rat

**Brik Y.**, Poisbeau P., Melchior M., Impact of neonatal maternal separation on the development of neuropathic pain induced by chronic constriction of the sciatic nerve in later life in rats

### ❖ Présentation de posters

**Congrès Neurofrance** 2023, du 24 au 26 mai, Lyon, France :

**Brik Y.** , Gazzo G, Caussaint A, Lelièvre V., Poisbeau P., Melchior M., (2023) Consequences of neonatal maternal separation on the development of sensorimotor functions and pain sensation: A comparison between Sprague Dawley and Wistar rat

### ❖ Communications orales

**Communications au grand public au cours de l'année 2023** : Intervention dans plusieurs collèges et lycées sur le thème des métiers dans la recherche scientifique « la Recherche est à vos portes » avec le Jardin des Sciences de l'université de Strasbourg.

**NeuroStra Scientific Day** 2023, 1<sup>er</sup> Décembre, Strasbourg, France :

*Brik Yasmine* (Strasbourg, France) Blitz lecture: Consequences of neonatal maternal separation on the development of sensorimotor function and pain sensation : A comparison between Wistar and Sprague Dawley rat

**19<sup>ème</sup> Symposium du Réseau Français de Recherche sur la Douleur** 2024, du 12 au 13 Avril, Nice, France :

*Brik Yasmine* (Strasbourg, France) : Impact of neonatal maternal separation stress in neuropathies induced by chronic constriction of the sciatic nerve

**Doctoral School Days ED414** 2024, du 25 au 26 Avril, Strasbourg, France :

*Brik Yasmine* (Strasbourg, France) : Consequences of neonatal maternal separation stress on a rodent model of neuropathy

**Journée des Jeunes Chercheurs et Jeunes Chercheuses** 2024, 4 Juillet, Strasbourg, France :

*Brik Yasmine et Illouz Hannah* (Strasbourg, France) : Conséquences de la séparation maternelle néonatale sur la douleur et la cognition

## ❖ **Prix et distinctions**

**2024 : Prix pour la meilleure illustration dans la catégorie scientifique**

En collaboration avec Guillaume Reho pour la photo « Maternal Heat », *INCIImage contest*

**2024 : Prix pour la meilleure présentation orale dans la catégorie Long Talk Lectures**

*Doctoral School Days ED414*

**2024 : Prix pour la meilleure présentation orale dans la catégorie vulgarisation scientifique**

En collaboration avec Hannah Illouz, *Journée des Jeunes Chercheurs et Jeunes Chercheuses*

**2021 : Bourse de thèse EURIDOL** – Université de Strasbourg

## Résumé de thèse

### **Introduction :**

L'hypothèse de l'origine développementale des maladies ou plus simplement l'impact de l'adversité précoce sur la santé de l'individu est une hypothèse largement acceptée et de plus en plus étudiée aujourd'hui. L'adversité précoce est un terme large regroupant plusieurs types de stress rencontrés dans la période néonatale ou durant l'enfance tels qu'une naissance prématurée, des complications de santé en début de vie, des abus ou des négligences durant l'enfance, des traumatismes psychologiques ou encore de la maltraitance. Comme ces derniers ont lieu durant une période de grande plasticité cérébrale et de **neurodéveloppement**, ils sont des facteurs augmentant le risques de développer à l'âge adulte des **troubles comportementaux et émotionnels** comme l'anxiété ou la dépression, des troubles mentaux tels que la schizophrénie, ou encore des réponses altérées à la **douleur** (Felitti et al., 1998; Grunau et al., 2006; Hakamata et al., 2022; Mandelli et al., 2015; Melchior et al., 2021; K. E. Smith & Pollak, 2020). Etant donné la corrélation entre ces facteurs et le développement de troubles et maladies chez l'adulte (Hakamata et al., 2022), il convient d'étudier les mécanismes neurobiologiques à l'origine des dérèglements observés afin de mettre en place de meilleures stratégies thérapeutiques.

En laboratoire, un grand nombre de modèles de rongeurs mimant ce type de stress sont utilisés afin de mettre en évidence les altérations du fonctionnement du système nerveux (Kuhlman, 2024; Murthy & Gould, 2018). Parmi eux, le modèle de séparation maternelle néonatale (SMN) chez le rat consiste en la séparation des ratons du nid et de la mère durant trois heures par jour du deuxième jour suivant la naissance au douzième. Le phénotype du modèle à l'âge adulte est caractérisé par un comportement d'anxiété, des troubles cognitifs ainsi qu'une altération du système nociceptif. Précédemment, notre laboratoire a montré une altération des réponses nociceptives mais aussi des réseaux neuronaux mis en jeu à la fois dans le contrôle de la douleur et des réponses émotionnelles, notamment le système oxytocinergique.

En nous centrant sur la douleur, par son rôle et sa fonction adaptative essentielle dans la survie d'un individu, nous avons souhaité explorer les conséquences à court et long terme du stress de SMN en prenant en compte les composantes sensorielles, cognitives et émotionnelles de la douleur. Ainsi les travaux de ma thèse se sont regroupés autour de trois objectifs distincts :

- Caractériser les effets de la SMN sur le **neurodéveloppement** en se basant sur une batterie de test évaluant l'acquisition de réflexes sensori-moteur, l'émission de vocalisation ultrasonore (USV) des ratons en réponse à une séparation de la mère et les réponses nociceptives à l'aide de test adaptés, et tout cela sur deux souches de rat.
- Evaluer à l'âge adulte les conséquences de la SMN sur la **contagion émotionnelle** à la douleur, qui est la fonction cognitive chez l'animal se rapprochant le plus de l'empathie à la douleur, et les comportements prosociaux associés.

- Evaluer le développement d'une **douleur neuropathique** et ses comorbidités associées chez des rats adultes ayant un passé de SMN.

### Résultats :

- *Etude des conséquences de la SMN sur le neurodéveloppement*

Au laboratoire, des résultats préliminaires obtenus par le Dr Gazzo Géraldine suggèrent un effet neurodéveloppemental de la SMN chez le rat Wistar (WR). La première partie de ma thèse a eu pour objectif de compléter ces résultats tout d'abord par l'étude d'une seconde souche de rat, Sprague Dawley (SD), également utilisée au laboratoire et pour laquelle les effets de la SMN peuvent parfois différer. Puis, par la mise en place au laboratoire pour la première fois d'une approche d'analyse des émissions de vocalisations ultrasonores (USV) en réponse à la SMN qui permet d'évaluer les états affectifs chez le raton car ces derniers vocalisent lorsqu'ils se trouvent en situation de détresse (Hofer et al., 2001). La comparaison de deux souches de rat pour toutes ces évaluations permet d'apporter une information supplémentaire sur l'importance du patrimoine génétique et épigénétique face au stress et de faire un parallèle avec les différences interindividuelles observées chez l'Homme.

Nous avons observé un développement et des performances sur certains tests qui différaient entre les souches. Les rats WR présentaient une acquisition ou de meilleures performances à la plupart des tests que les rats SD. A propos de l'émission d'USV, les rats WR vocalisaient plus que les SD. Les seuils nociceptifs mécaniques des SD étaient plus haut que ceux des WR, aucune différence n'a été observée concernant les seuils thermiques. La SMN a induit une acquisition des réflexes plus précoce ou de meilleures performances pour certains tests uniquement chez les rats SD. Il n'y a pas eu d'effet significatifs de la SMN pour aucun des tests chez les WR, excepté faite d'une tendance au retard pour un test d'évitement de la falaise. De manière globale, la SMN n'a pas eu d'impact majeur sur l'acquisition de réflexe car l'effet observé sur les rats SD fut transitoire et le déphasage de quelques jours seulement. Aucune différence induite par le stress concernant l'émission d'USV n'a été observée. La SMN a également induit de manière durable une hypersensibilité nociceptive chez les deux souches telle que décrite dans les précédents travaux de notre équipe. La conclusion principale apportée par cette étude est que le stress néonatal n'a pas eu d'effet délétère lors du neurodéveloppement sur des fonctions majeures et importantes à la survie de l'individu impliquant la motricité par exemple, mais que certaines fonctions plus fines comme la nociception sont altérées de manière pérenne. Ces résultats ont abouti à un article scientifique prêt à être soumis (ARTICLE 1 de la thèse).

- *Impact de la SMN sur la contagion émotionnelle à la douleur*

De précédentes études effectuées par notre laboratoire ont mis en évidence une atteinte du système oxytocinergique dans les contrôles descendants inhibiteurs de la nociception chez le rat par la SMN (Melchior et al., 2018). Ce système est impliqué également dans les comportements liés aux émotions, par exemple la contagion émotionnelle, qui constitue l'une des composantes de l'empathie observable chez l'Homme. Au cours de ma thèse, nous avons donc souhaité évaluer pour la première fois cet aspect chez le rat ayant subi un stress de SMN et avons développé en conséquence un protocole d'évaluation de la contagion émotionnelle

de la douleur. Celui-ci se base sur l'étude du comportement d'une dyade d'animaux (hébergés ensemble), l'un démonstrateur recevant un stimulus douloureux et le second ne recevant aucune injection mais pouvant faire preuve de comportements prosociaux de consolation envers l'autre, voir même présenter des signes d'hypersensibilité nociceptive, indices d'une contagion émotionnelle. Dans notre cas, nous avons mesurer les comportements des dyades lorsque l'animal démonstrateur reçoit une injection sur la patte d'un agent inflammatoire (adjuvant complet de Freund) induisant une douleur localisée durant deux semaines, chez des animaux contrôle (CTRL) et des animaux SMN.

Nous ne rapportons pas de diminutions significatives des seuils nociceptifs mécaniques et thermiques chez les animaux observateurs à la fois dans le groupe CTRL et SMN suivant l'injection d'agent inflammatoire chez l'animal démonstrateur. L'étude des comportements dits de réconforts et consolations apportés à l'animal démonstrateur par l'animal observateur étaient plus important dans le groupe CTRL comparé aux animaux injectés avec de la saline mais cet effet n'était pas significatif chez les animaux SMN. On en conclut que les comportements prosociaux sont impactés par le stress néonatal. Ces travaux ont abouti à la publication d'une revue sur le sujet de l'empathie chez l'Homme et l'animal à la revue *Douleur et Analgésie* (en annexe) et également à un article scientifique en cours de rédaction (ARTICLE 2). Les deux manuscrits sont présentés dans la thèse.

- *Impact de la SMN sur la douleur neuropathique et les comorbidités associées*

Les expériences adverses en début de vie sont un facteur de risque dans le développement de douleur chronique et les comorbidités associées (You et al., 2019). De ce fait, le dernier objectif était d'évaluer le développement d'une neuropathie (par constriction chronique du nerf sciatique, modèle du « cuff ») et les comorbidités associées chez l'adulte dans ce modèle de SMN. Ces comorbidités sont observées chez la souris mais pas chez le rat. De plus, à notre connaissance, ce modèle précis de neuropathie n'a jamais été évalué chez des animaux ayant subi le stress de SMN. L'hypothèse de travail était que les rats ayant subi la SMN, après l'induction d'une douleur neuropathique, présenteraient des symptômes nociceptifs aggravés et des comorbidités comportementales et cognitives. Nous avons donc utilisé des approches comportementales pour évaluer la sensibilité nociceptive des animaux, leur phénotype anxieux et dépressif, ainsi que leurs interactions sociales et leurs fonctions cognitives.

Dans cette expérience, les animaux ayant subi la SMN présentaient bien à l'âge adulte une hypersensibilité nociceptive à l'état basal. Cependant, après la chirurgie, les animaux SMN développèrent une hypersensibilité mécanique et thermique au froid, mais bien moins importante comparée au groupe CTRL et avec un délai de 15 jours. Concernant les comportements d'anxiété, de dépression et de sociabilité, il nous a été difficile de conclure sur ces effets à cause de comportements inattendus des rats du groupe CTRL. La neuropathie a induit des altérations dans l'apprentissage chez les rats CTRL et SMN. Néanmoins les tests de mémoire de travail, sociale et spatiale démontrent que les animaux SMN avaient une mémoire de travail et sociale fonctionnelle mais une mémoire spatiale altérée. Les rats SMN présentent donc de la résilience face à la neuropathie, malgré leur hypersensibilité nociceptive. Plus particulièrement, ces résultats semblent démontrer que les processus menant normalement à la douleur chronique chez les animaux CTRL sont altérés chez les SMN, mais que cette altération a conduit à des symptômes moins intenses plutôt qu'à une vulnérabilité

dont nous avions formulé l'hypothèse au début de ce travail de recherche. Ces travaux ont donné lieu à un article en cours de rédaction et présenté dans la thèse (ARTICLE 3).

### **Conclusion :**

Notre investigation sur les différentes conséquences de la SMN à travers la vie d'un individu nous a permis de mettre en évidence d'importants éléments prouvant la résilience ou plutôt la résistance face à ce type de stress dans ce modèle animal en ce qui concerne des fonctions importantes à la survie de l'individu (étude sur le neurodéveloppement) mais des déficits dans les comportements de type sociaux (empathie à la douleur). Concernant la nociception, nous observons une hypersensibilité persistante à l'âge adulte et une altération du système nociceptif menant à un développement divergent de la neuropathie.

L'étude sur le neurodéveloppement démontre également l'aspect inné de la résistance à certains types de stress, comme le montre l'effet opposé de la SMN sur les deux souches : accélération ou tendance au retard dans l'acquisition des réflexes, révélant l'importance des antécédents et des prédispositions génétiques. A l'opposé l'hypersensibilité persistante aux stimuli nociceptifs indique une altération du système nociceptif et une perturbation possible de fonctions plus complexes ou plus fines à l'âge adulte.

L'empathie à la douleur chez plusieurs espèces est une fonction qui reste grandement liée à la survie du groupe car au cœur des interactions sociales et permet d'être réceptif aux états affectifs d'autrui qui renseignent (dans le cas de la douleur) de potentiels dangers présents dans l'environnement. Nous concluons ici sur une altération de cette fonction par le stress de SMN.

La dernière partie de notre étude met en évidence un développement inhabituel des symptômes nociceptifs suite à la neuropathie se traduisant par une diminution de son intensité et délais dans son apparition. Cela démontre une potentielle altération des mécanismes nociceptifs sous-tendant la chronicisation de la douleur. Afin de trouver de potentielles explications à ce phénomène, des analyses PCR sur le tissu nerveux (péphérique et centrale) pour plusieurs marqueurs inflammatoires sont en cours.

# Introduction

## I. Introduction

### A. Chapitre 1 : Aspects neurodéveloppementaux

Tout comme l'incipit d'un livre, les premiers moments de vie peuvent marquer le ton de l'histoire de vie d'un individu, le rendant plus vulnérable ou plus résilient. C'est là que réside le questionnement entourant le concept de l'origine développementale de la santé et des maladies (DOHaD) issu des travaux de Barker et son équipe. Ils établissent pour la première fois dans les années 80 un lien entre adversité précoce et risques liés à la santé (Barker, 2004; Charles et al., 2016).

Quelle part doit-on à notre héritage génétique, au bon ou difficile déroulement de la *vie in utero*, à l'épigénétique, à l'environnement de nos premiers moments de vie et finalement au hasard ? Halfon et Hochstein proposent au début du siècle l'idée de « Lifecourse Health Development » présentant la vie d'un individu et sa trajectoire de santé comme un continuum dans lequel tous ces éléments et d'autres d'aspects socio-économiques sont pris en compte afin de mieux comprendre, expliquer mais aussi prévenir la maladie (Halfon & Hochstein, 2002).

Il est aujourd'hui admis que les expériences adverses de la période périnatale et de l'enfance peuvent avoir des conséquences à long terme sur les fonctions cérébrales, le comportement et la santé d'un individu (Felitti et al., 1998; McEwen, 2008). Cette période va donc se définir dans ce contexte de recherche comme une période de grande plasticité, de vulnérabilité mais aussi de genèse de processus d'adaptation.

C'est ainsi que nous arrivons actuellement à une pratique de la médecine où la prévention est un pilier et une politique nécessaire face à la hausse de la fréquence des maladies chroniques responsables selon l'Organisation Mondiale de la Santé de 70% des décès dans le monde (Organisation mondiale de la santé, s. d.).

C'est dans ce contexte général que s'inscrit ce travail de thèse dans lequel les conséquences à court et long terme d'un stress précoce ont été étudiées en portant l'accent sur la douleur, par son rôle essentiel dans la survie et l'intégrité de l'organisme, et ses différentes composantes : sensorielle, cognitive et émotionnelle.

1. La plasticité du système nerveux et sa vulnérabilité en début de vie

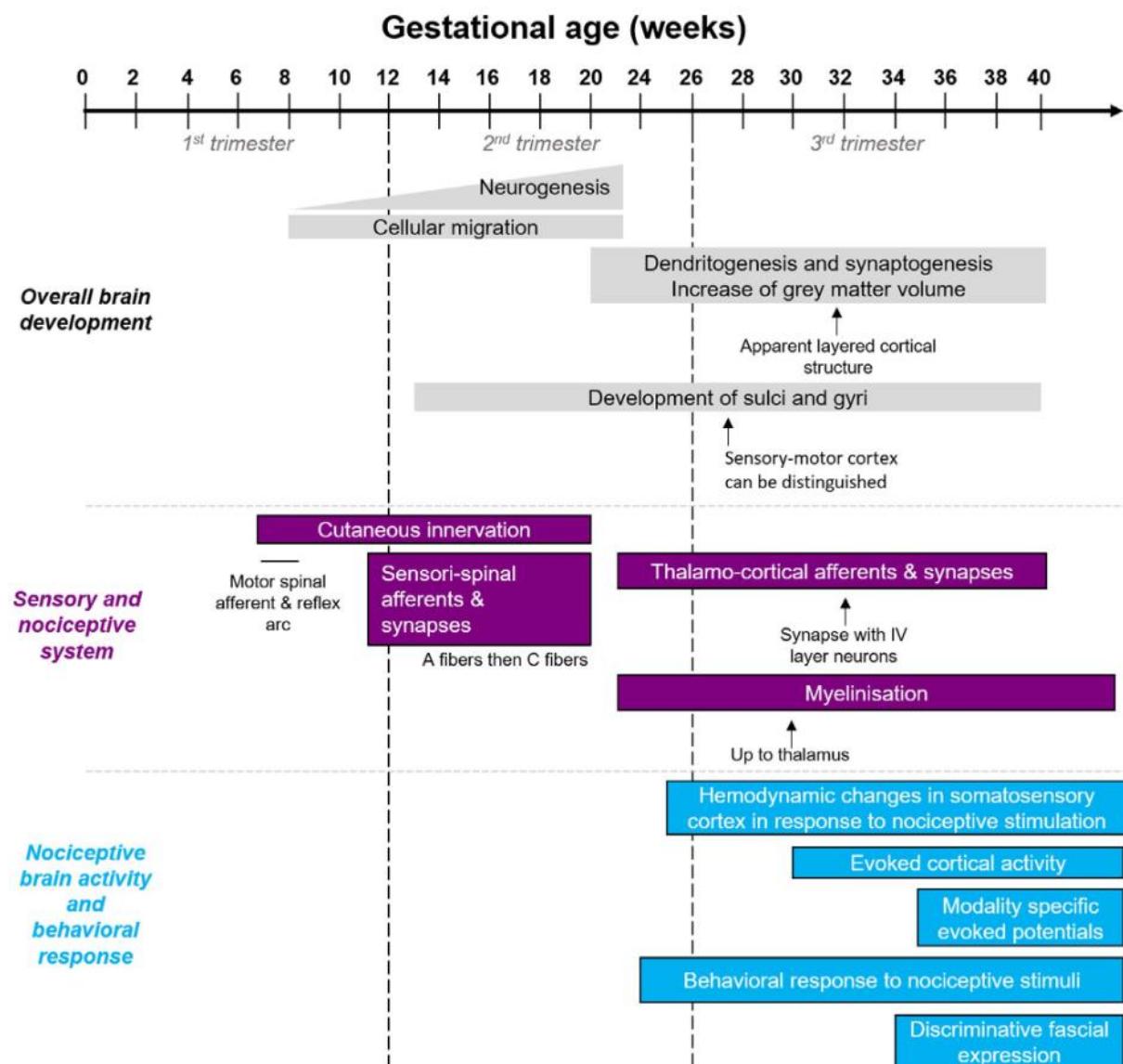
a) *Neurodéveloppement dans la période périnatale*

Chez l'Homme tout comme chez la plupart des mammifères, la première partie du neurodéveloppement est organisationnelle avec une mise en place des circuits nerveux et des réseaux neuronaux au sein des différentes structures cérébrales par des processus de prolifération, de migration, et de différenciation cellulaire. La deuxième partie est plus fonctionnelle avec la mise en place de nouvelles connections (e.g. synaptogenèse) et la contribution de plus en plus importante des cellules gliales (e.g. myélinisation) (**Figure 1**) (Rice & Barone, 2000; Semple et al., 2013).

La période postnatale se caractérise également par une grande plasticité pendant laquelle les processus de synaptogenèse se poursuivent et sont très importants jusque l'âge de 2 ans et ceux de myélinisation jusqu'à l'âge adulte (Monk et al., 2001; Sinner et al., 2014; Tau & Peterson, 2010). La densité des synapses augmente en effet pour atteindre son maximum au cours de la deuxième et troisième semaine postnatale, en même temps que l'astrogénèse (Rice & Barone, 2000; Semple et al., 2013; Watson et al., 2006). Plus précisément, dans le cerveau humain, à l'aide d'observation de coupes de cerveaux au microscope électronique, deux périodes différentes ont été définies : l'une de production rapide de synapses survenant jusque l'âge de 8 mois et une seconde ultérieure plus longue d'élimination des synapses s'étendant au-delà de l'âge de 3 ans (Huttenlocher et al., 1982).

Chez le rongeur, les études par imagerie par tenseur de diffusion et de coloration de la protéine basique de la myéline ont démontré que la myélinisation dans les régions motrices et sensorielles du cerveau ainsi que l'augmentation de la densité axonale et dendritique ont lieu

vers P10 (où P = jour post natal) et atteignent leur maximum vers P20 (Bockhorst et al., 2008; Downes & Mullins, 2014). Chez l'Homme, l'imagerie par résonance magnétique ciblant des modifications de la taille et de l'intensité du signal des sous-régions du corps calleux montre que le taux le plus important d'augmentation de la taille de ces régions a lieu pendant l'enfance (Keshavan et al., 2002). Tout cela confère donc au système nerveux immature une plasticité durant la période néonatale qui se perd à l'âge adulte.



**Figure 1 : Schéma résumant les grandes étapes de neurodéveloppement**

Représentation de la vue d'ensemble des processus de développement pendant la gestation chez le fœtus humain, de la maturation de l'activité cérébrale et de la réponse comportementale à la stimulation nociceptive (Melchior et al., 2021).

Un bon développement des fonctions sensorimotrices se caractérise donc par l'apparition progressive de réflexes spécifiques à des moments critiques dépendant d'un développement neurologique adéquat, notamment de la migration, de la myélinisation et de la formation des synapses (Nguyen et al., 2017).

*b) Système nociceptif du nouveau-né*

Plus particulièrement, le système nociceptif sous-tendant la douleur poursuit lui aussi sa maturation après la naissance. La douleur est définie par l'International Association for the Study of Pain (IASP) comme « une expérience sensorielle et émotionnelle désagréable associée, ou ressemblant, à celle liée à une lésion tissulaire réelle ou potentielle » (Raja et al., 2020). La douleur est le résultat de l'activation de neurones sensoriels et du transfert de l'information nociceptive depuis la périphérie jusqu'au cortex. Pour présenter brièvement ce système, des stimuli de fortes intensités activent les terminaisons axonales portées par des neurones faiblement myélinisés de type A $\delta$  ou amyélinisés de type C. Ces fibres transmettent l'information vers la corne dorsale de la moelle épinière (ME), où elle est modulée par un réseau complexe d'interneurones, avant d'être transmise aux centres supraspinaux par des neurones de projections. Différentes voies ascendantes existent, et prennent en charge différents aspects de la douleur (sensori-discriminatif, émotionnel...). La voie principale concerne la voie spino-thalamique, qui transfert l'information nociceptive au thalamus puis au cortex somatosensoriel pour traiter notamment l'aspect sensori-discriminatif de la douleur. Par ces différentes voies, c'est l'intégration corticale consciente de l'information nociceptive transmise par les fibres afférentes primaires qui engendrera l'expérience de la douleur et une réponse comportementale adaptée. De plus, différents systèmes descendants issus des centres supraspinaux et envoyant des projections sur la corne dorsale de la ME, peuvent moduler l'intensité du message nociceptif. Faire l'expérience de la douleur est donc possible dès la naissance car le système nociceptif est fonctionnel dès la fin du 2ème trimestre de grossesse chez le fœtus (**Figure 1**) (Fitzgerald, 2005). L'étude princeps d'Anand et Hickey démontre enfin dans les années 80 que les nouveau-nés et les prématurés, dès 26-28 semaines de gestation, sont capables de percevoir un stress ou une douleur, et que

l'excès de stimulations douloureuses peut altérer le bon fonctionnement du système nociceptif (Anand & Hickey, 1987). Ceci a été plusieurs fois confirmé à l'aide des études d'enregistrement de l'activité cérébrale, qui démontrent chez les nouveau-nés grands prématurés des réponses hémodynamiques dans le cortex somatosensoriel à la suite d'une ponction au talon ou un prélèvement sanguin dès la 25<sup>ème</sup> semaine (Bartocci et al., 2006; Slater et al., 2006). Ces réponses matures et se raffinent avec l'âge. Les études EEG démontrent par exemple que les potentiels évoqués induit par ces ponctions au talon évoquent une activité non spécifique avant environ 35 semaines, alors qu'une composante nociceptive spécifique est visible sur le potentiel évoqué à partir de cette date (Fabrizi et al., 2011).

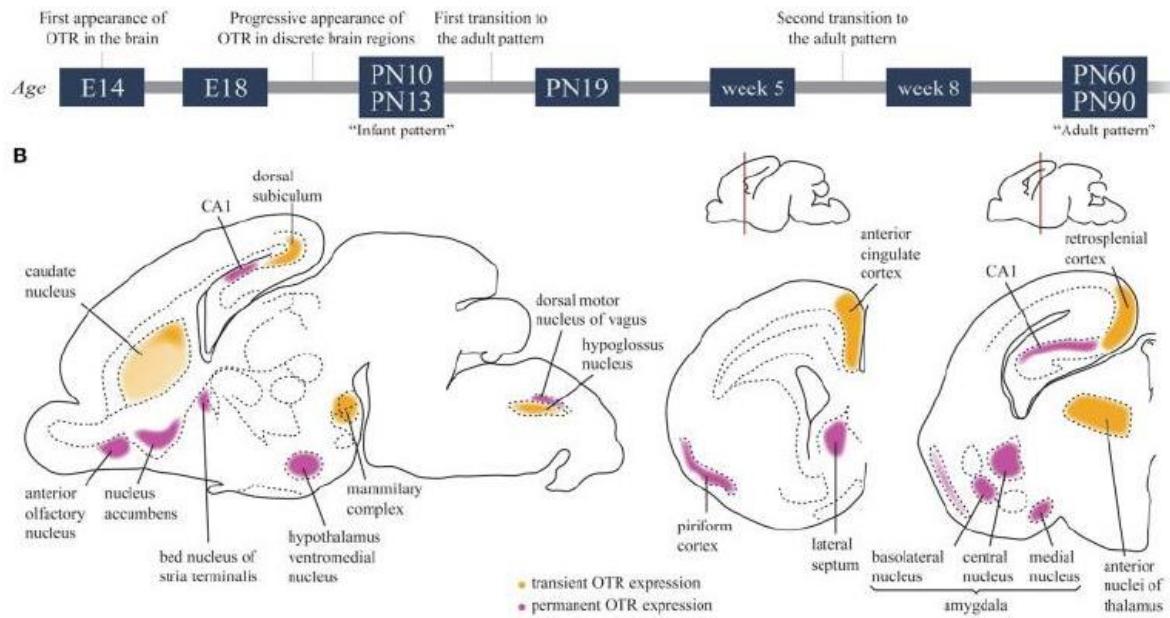
Si l'enfant a la capacité de ressentir la douleur très tôt, les voies nociceptives restent en pleine maturation durant le 3<sup>e</sup> trimestre de gestation et après la naissance. Une réorganisation importante des afférences A et C sur la corne dorsale de la ME a notamment lieu durant la période postnatale. Les fibres A présentent à la naissance de manière diffuse sur les lamina I à IV vont progressivement se restreindre aux couches plus profondes de la corne dorsale sur les lamina III et IV entre le premier jour postnatal (P1) et P21 chez le rongeur (Beggs et al., 2002). Les fibres C quant à elles, ne sont pas complètement fonctionnelles avant P10-P14 (Fitzgerald, 1988; Jennings & Fitzgerald, 1998).

Concernant les processus inhibiteurs dans la ME médiés par les récepteurs GABA A et glycine, ils se mettent en place progressivement au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre chez l'Homme et après la naissance chez le rongeur (Fitzgerald, 2005). Ils subissent eux aussi des changements critiques dans la période postnatale affectant la sélectivité des synapses (Baccei & Fitzgerald, 2004; Keller et al., 2001) et l'homéostasie chlorure (H. Li et al., 2002; Rivera et al., 1999; Stil et al., 2009). Dans les neurones immatures, le GABA induit une dépolarisation du neurone (action « excitatrice ») à cause d'une différence de maturité entre les systèmes permettant la sortie du chlore, le co-transporteur potassium-chlore KCC2 et son entrée, le co-transporteur sodium-potassium-chlore NKCC1 (K. Li & Xu, 2008). L'expression de KCC2 augmente progressivement pendant la première semaine de vie postnatale, alors que l'expression de NKCC1 diminue, induisant le changement graduel vers une action inhibitrice du GABA (Clayton et al., 1998;

Kahle & Staley, 2008; Rivera et al., 1999). Chez le nouveau-né, la transmission inhibitrice est donc immature.

Enfin la maturation des contrôles descendants inhibiteurs survient elle aussi assez tard. Chez le rongeur, une réorganisation anatomique et fonctionnelle du système noradrénergique se poursuit jusque P7 et jusque P21 pour le système sérotoninergique (de Kort et al., 2022; Rajaofetra et al., 1992). Le système opioïdergique mature également tardivement. L'action analgésiante de la substance grise périaqueducale (PAG) par stimulation électrique n'est ainsi obtenue qu'à partir de la 3<sup>e</sup> semaine post natale (van Praag & Frenk, 1991). Des démonstrations chez le rat ont permis d'observer que l'activation des récepteurs opioïdes Mu dans la PAG induisait bien une inhibition des réponses nociceptives chez l'adulte mais que cela augmentait la sensibilité aux stimuli mécaniques jusque P21 et jusque P8 après activation de ces récepteurs dans la moelle rostrale ventromédiale (Kwok et al., 2014; Schwaller et al., 2016).

Enfin, un dernier système descendant est d'un intérêt particulier dans le cadre de cette thèse, il s'agit de celui de l'ocytocine. L'ocytocine est un petit neuropeptide synthétisé au niveau central par des neurones magnocellulaires et parvocellulaires de l'hypothalamus, au sein des noyaux paraventriculaires, supraoptiques, et accessoires. Libérée à la fois dans différentes structures cérébrales et dans la circulation sanguine, elle possède donc une action centrale et périphérique et est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions et comportements : fonctions reproductrices, rénales, cardiovasculaires, comportements sociaux et d'agression, mémoire et apprentissage, anxiété... Elle possède également un effet analgésiant, périphérique et central. En particulier, lors de sa libération spinale par les neurones parvocellulaires, l'ocytocine recrute des interneurones glutamatergiques qui activent des interneurones inhibiteurs GABAergiques, réprimant ainsi les afférences nociceptives des fibres A<sub>δ</sub> et C (Breton et al., 2008). Or ce système ocytocinergique, par son étude chez le rongeur n'est considéré comme mature qu'à P20 (Choy & Watkins, 1979). L'expression des récepteurs à l'ocytocine, les OTR, change également lors de deux périodes clés, autour de P19-21, et à la puberté (**Figure 2**) (Knobloch & Grinevich, 2014).



**Figure 2 : Profil d'expression des récepteurs à l'ocytocine dans le cerveau du rongeur à différents âges.**

D'après (Grinevich et al., 2015).

Tous ces mécanismes ont une conséquence comportementale et participent à expliquer l'hypersensibilité nociceptive observée chez les nouveaux nés, notamment chez les prématurés, et dans les modèles animaux (Fitzgerald, 2005; Juif et al., 2016; Melchior et al., 2018). Cette période de maturation et plasticité importante rend donc le système nociceptif du nouveau-né vulnérable à des stress qui pourraient avoir des retentissements sur les voies ascendantes (codage des informations douloureuses) et les voies descendantes (modulation des réponses douloureuses).

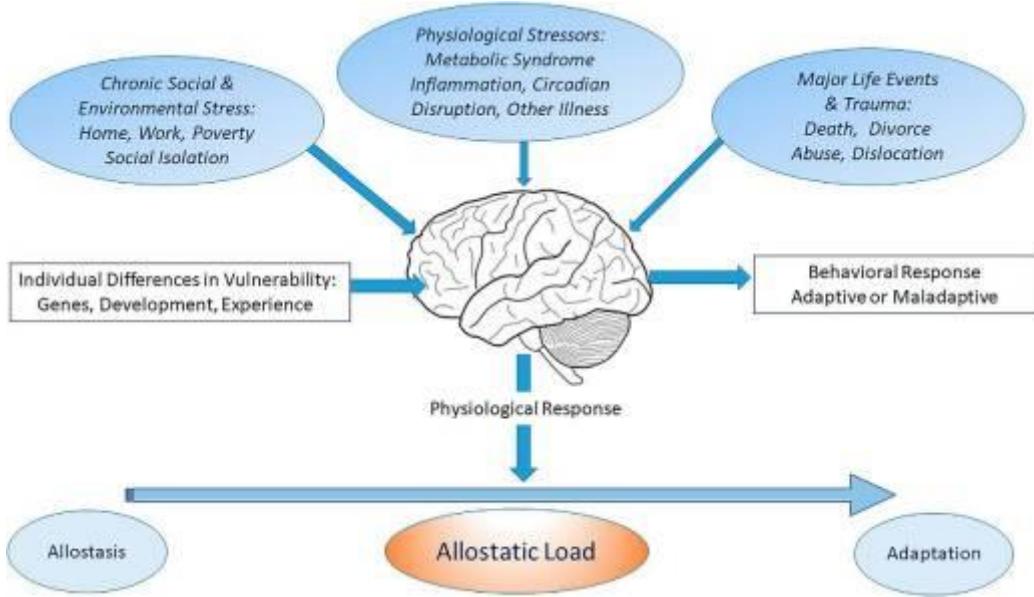
## 2. Impact de l'adversité précoce

### a) Réponse au stress

Le terme « stress » est couramment utilisé pour désigner un stimulus, « le stresseur », qui perturbe l'homéostasie mais désigne également la réponse physiologique d'un organisme aux perturbations biologiques et psychiques induites par ce dernier, que celui-ci constitue une

menace réelle ou perçue (Selye, 1998). Le stress est donc une réaction qui permet l'adaptation (réaction *fight or flight*) et qui recrute l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) et le système sympathique. Brièvement, les neurones du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus vont libérer la vasopressine et la corticolibérine qui stimuleront l'hypophyse antérieure pour libérer l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). L'ACTH induira ensuite la libération de glucocorticoïdes (cortisol pour l'Homme et corticostérone pour le rongeur) par les glandes surrénales. Ces derniers ont un large éventail d'actions. Comme l'indique leur nom, les glucocorticoïdes agissent sur l'utilisation du glucose et plus généralement sur l'équilibre énergétique. Ils peuvent aussi agir comme facteur de transcription ou via des effets non-génomiques comme la libération de glutamate ou stimulation de la libération d'endocannabinoïdes (Lupien et al., 2009; McEwen & Akil, 2020). Des structures comme l'hippocampe possédant beaucoup de récepteurs aux glucocorticoïdes permettent le rétrocontrôle négatif de cette réaction pour un retour à l'homéostasie. Mais l'hippocampe est également sensible et vulnérable face au stress s'il devient chronique (Lupien et al., 2009). Si l'homéostasie représente la stabilité des paramètres physiologiques, l'allostasie par analogie correspond aux processus physiologiques et comportementaux permettant de maintenir cette stabilité par le changement (McEwen, 2020). Ces processus comprennent un recrutement du système nerveux autonome, métabolique et immunitaire en interaction avec l'axe HHS (McEwen, 2006). Dans le cas d'une exposition chronique au stress, la charge allostastique se trouve donc augmentée rendant le retour à l'homéostasie plus critique (**Figure 3**). L'usure de ce système produit par une surcharge allostastique ou une exposition à un stress chronique induit des dérèglements de ces mêmes mécanismes d'adaptation.

Dans le cadre de ce travail sur les conséquences de l'adversité précoce, le stress étudié est un stress chronique durant la période néonatale pouvant impacter la fonctionnalité du système nerveux et les facultés d'adaptation de l'organisme (**Figure 3**). Ainsi, durant cette période, une exposition chronique au stress entraîne des dérégulations de ce système, se traduisant par une réactivité accrue au stress à l'âge adulte, une réduction du volume de l'hippocampe avec des conséquences psychologiques et comportementales (Lupien et al., 2009).



**Figure 3 : Surcharge allostataque induite par l'accumulation de stress.**

D'après (McEwen and Akil, 2020).

### b) Conséquences de l'adversité précoce chez l'Homme

L'adversité précoce est un terme générique regroupant plusieurs et différents types de stress survenant tôt dans la vie d'un individu. Cela peut inclure la naissance prématurée, les abus et traumatismes physiques ou émotionnels, un foyer dysfonctionnel ou encore des négligences émotionnelles ou physiques survenant durant l'enfance (McLaughlin et al., 2019). Il est aujourd'hui admis que tous ces types de stress entraînent des conséquences délétères sur le développement du cerveau jusqu'à l'âge adulte et altèrent les fonctions cognitives, émotionnelles ainsi que les réponses à la douleur (Anand & Scalzo, 2000; Y. Chen & Baram, 2016; Grunau et al., 2006; Hakamata et al., 2022; McLaughlin et al., 2019; Melchior et al., 2021).

L'adversité précoce en début de vie peut provoquer des altérations à long terme de la réponse au stress et des circuits cérébraux impliqués dans l'adaptation au stress, prédisposant ainsi les individus au développement de psychopathologies (Heim et al., 2010; Juruena et al., 2020). Par exemple, les traumatismes subis dans l'enfance ont été associés à une dysrégulation de

l'axe HHS causée par un déséquilibre entre les récepteurs glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes, provoquant ainsi une vulnérabilité accrue aux troubles de l'humeur à l'âge adulte (Baes et al., 2014). L'étude par imagerie par résonance magnétique a permis de démontrer que cette population présente également une réduction du volume de l'amygdale, du cortex préfrontal médian (cPFC), de l'hippocampe ainsi qu'une activation accrue de l'amygdale en cas de menace (McLaughlin et al., 2019). Les personnes ayant subis une ou plusieurs formes d'adversité précoce ont plus de risques de développer divers troubles psychiatriques. Elles sont notamment plus à risques de développer des troubles anxieux, quatre fois plus susceptibles de développer un trouble dépressif, cinq fois plus susceptibles de développer un état de stress post-traumatique ou encore un trouble obsessionnel-compulsif (Hughes et al., 2017; Scott et al., 2010). Enfin, le circuit de la récompense étant en relation avec l'activité de l'axe HHS ces populations semblent être associées à une probabilité plus élevée de consommer des substances addictives et de développer des dépendances à l'âge adulte (Lijffijt et al., 2014).

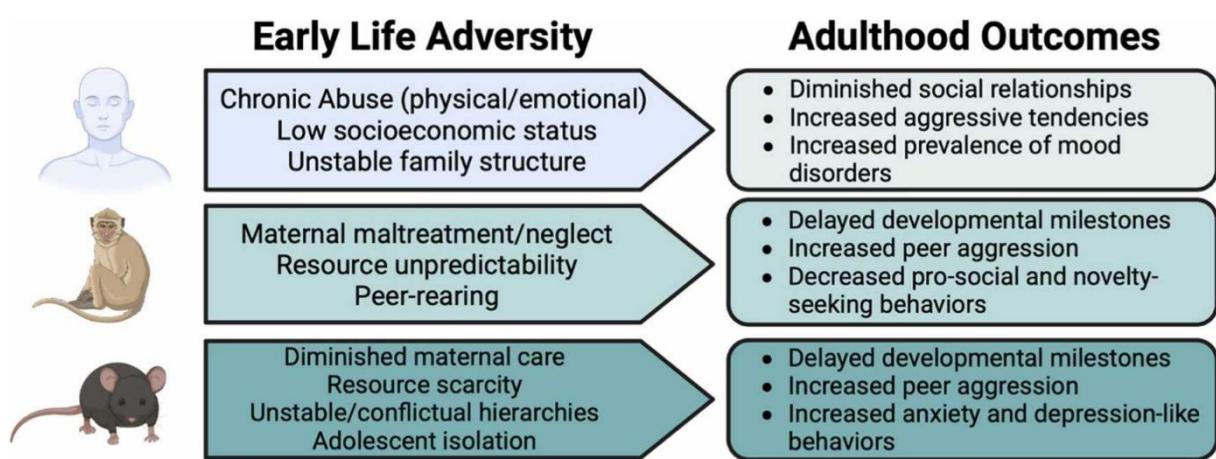
Concernant les effets sur la douleur, l'impact des douleurs néonatales et de la prématureté, qui concerne les naissances avant 37 semaines d'aménorrhée, ont été souvent étudiés. La prématureté est associée à un plus grand risque de présenter des troubles du neurodéveloppement, notamment des troubles de l'attention (Aylward, 2003), un retard mental, une diminution des capacités cognitives et des troubles de l'apprentissage (Hack et al., 2002; Moster et al., 2008). Concernant les effets sur la sensibilité douloureuse, on retrouve une certaine variabilité des résultats dans la littérature. Gruneau et collaborateurs rapportent que les enfants de 9 à 14 ans nés prématués ou ayant été hospitalisés à la naissance notent plus intensément leur douleur suite à un stimuli chaud nociceptif (Grunau et al., 2006; Hermann et al., 2006). Cette hypersensibilité a également été observée chez des adolescents âgés de 12 à 18 ans (M. D. Williams & Lascelles, 2020). Néanmoins, une hyposensibilité thermique généralisée a aussi parfois été observée chez des enfants nés prématués âgés entre 11 et 12 ans et plus tard à l'âge adulte (F. R. Walker et al., 2009). Dans cette dernière

étude, une hypersensibilité a cependant été reportée chez les femmes en réponse à un stimulus nociceptif prolongé.

Dans la littérature, des méta-analyses ont pu démontrer que des abus dans l'enfance sont corrélés à des douleurs chroniques à l'âge adulte (Davis et al., 2005; Melchior & Poisbeau, 2015). Par exemple, un grand nombre de patients souffrant de migraines ou de syndromes du côlon irritable rapportent des antécédents de maltraitance dans l'enfance (Tietjen et al., 2015, 2016; C. A. Ross, 2005). D'autres études rapportent une plus grande évaluation et catastrophisation de la douleur chez cette même population (Yamada et al., 2017; Sansone et al., 2013).

### 3. Modèles d'adversité précoce

Afin de mettre en évidence les mécanismes sous-jacents des conséquences observées de l'adversité précoce sur les différentes fonctions nerveuses, plusieurs modèles de laboratoires ont été créés chez la souris et le rat. L'isomorphie, l'homologie et la prédictibilité sont des critères importants pour la validité d'un modèle animal. Ainsi, les modèles d'adversité précoce chez le rongeur doivent permettre par l'exposition à un ou plusieurs types de stress avant le sevrage d'induire des conséquences semblables et mener vers les troubles et pathologies décrits plus tôt chez l'Homme (**Figure 4**).



**Figure 4 : Similarités des conséquences de l'adversité précoce entre plusieurs espèces**  
(Parise et al., 2023)

En début de vie, le petit rongeur est entièrement dépendant du comportement et des soins maternels pour sa survie. Plusieurs modèles de stress précoce visent donc à perturber la quantité ou la qualité des interactions avec la mère, ce qui provoque un stress perturbant le développement des petits (Y. Chen & Baram, 2016; Bassey et al., 2023). L'importance des comportements maternels a également été montrée en étudiant les variations naturelles et en identifiant deux catégories de mamans rats, les « high grooming » (i.e. apportant beaucoup de soins comme le toilettage, l'allaitement) et les « low grooming ». Ces variations induisent chez le petit des comportements différents une fois adulte au niveau des réponses à la douleur

(C.-D. Walker et al., 2008), à la peur (Menard et al., 2004) ou encore au niveau des comportements sexuels (Cameron et al., 2011).

Les différents modèles existants vont différer sur la nature du stress, sa durée et la période sur laquelle il est induit, très souvent avant le sevrage. On retrouve des modèles altérant la « quantité » des soins maternels tels que la séparation maternelle néonatale (SMN) qui consiste à séparer quotidiennement (de P2 à P12 ou P21) les petits de la mère durant plusieurs heures, des modèles de handling avec des séparations courtes de 5 à 15 minutes (Plotsky & Meaney, 1993) et des modèles de privation maternelle où les petits sont isolés une fois pendant 24h, généralement à P9. D'autres modèles comme le « limited bedding and nesting » (LBN) se focalisent sur la qualité des soins et vont restreindre les ressources pour constituer le nid ou attribuer des cages aux animaux qui ne permettent pas sa construction de manière optimale ce qui va engendrer un stress chronique chez la mère dont les soins seront fragmentés et de moindre qualité. Notre laboratoire travaille avec un modèle de SMN (3 heures par jour de P2 à P12) utilisé dans tous les travaux présentés dans ce manuscrit et dont nous allons décrire les effets dans la partie suivante. Les modèles de séparation induisent une privation sensorielle de la mère et du nid et donc inévitablement une privation nutritive et des changements de températures qui impactent le système neuroendocrinien et par conséquent altèrent le bon développement des fonctions nerveuses et nociceptives (Kuhn & Schanberg, 1998). Ce type de stress induit de l'anxiété chez la mère et altère ses comportements qui sont souvent décrits comme fragmentés, incohérents mais également augmentés lors de la réunion avec les petits (Aguggia et al., 2013; Alves et al., 2020; Couto-Pereira et al., 2016).

#### 4. Conséquences de la séparation maternelle néonatale

##### a) *Conséquences sur la myélinisation du système nerveux*

Comme décrit plus haut, la SMN a lieu pendant une période critique de développement et de myélinisation importante. Un étude de (Yang et al., 2017) démontre qu'une SMN chez le rat de 3h/jour de P2 à P21 induit des altérations conséquentes de la myélinisation du cPFM et un

déficit en oligodendrocytes matures dû à une réduction des histones désacétylases 1 et 2 activant la voie de signalisation Wnt. Un sauvetage phénotypique a pu être réalisé dans cette même étude par l'inhibition de la voie de signalisation Wnt (Yang et al., 2017). Un autre modèle de SMN (3h/jour de P10-P15) chez le rat a permis de décrire une myélinisation précoce et mal régulée dans le cerveau en lien avec augmentation à P16 de l'expression de certains facteurs neurotrophiques et des molécules et récepteurs associés à la myéline (BDNF, OMgp et TrkB,) dans le cervelet qui se résorbait à P30 (Miki et al., 2014). Chez la souris, une SMN (3h/jour P2-P14) a également induit cette augmentation de l'expression des gènes liés à la myéline dans le cPBM ainsi qu'une différenciation oligodendrocytaire précoce à P15, conduisant à un appauvrissement du pool des cellules progénitrices oligodendrocytaires à l'âge adulte (Teissier et al., 2020). La SMN altère donc de manière importante les processus de myélinisation dans la période néonatale ce qui peut entraîner des déficits fonctionnels et cognitifs observés chez l'adulte que nous allons décrire.

#### *b) Conséquences cognitives et émotionnelles*

Le modèle SMN est décrit comme modulant durablement l'expression émotionnelle et la réponse au stress selon la durée de la séparation (Plotsky & Meaney, 1993). Ainsi le modèle du handling (séparation courte de 5 à 15min) augmente le comportement maternel, induit une diminution de l'anxiété et une augmentation du rétrocontrôle négatif exercé par les glucocorticoïdes sur l'axe HHS (Plotsky & Meaney, 1993). Dans les modèles de séparations longues, comme le nôtre, ce rétrocontrôle négatif est diminué conduisant à une activité de l'axe HHS amplifiée et à des réponses comportementales face au stress augmentées. C'est en effet l'un des premiers (et des plus observés) effet de la SMN dans la littérature. L'impact sur l'axe HHS induit un phénotype anxieux à l'âge adulte qui est associé à une augmentation de la libération de corticostérone suite à un stress aigu (Coutinho et al., 2002; Liu et al., 2000; O'Malley et al., 2011; Plotsky & Meaney, 1993). Notamment chez le rat, une augmentation de l'expression de la corticolibérine (*corticotropin releasing hormone* en anglais) et son récepteur dans l'amygdale, l'hypothalamus et le locus coeruleus est observée ainsi qu'une diminution

des récepteurs glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes dans l'hippocampe altérant le rétrocontrôle négatif en cas de réaction de stress (Ladd et al., 2004; Meaney et al., 1993; O'Malley et al., 2011; Plotsky & Meaney, 1993).

Dans de multiples tests évaluant l'anxiété et la réponse au stress les animaux ayant subis la SMN montrent à l'âge adulte une augmentation des comportements d'anxiété décelée par des tests comportementaux comme le labyrinthe en croix, l'openfield ou le réflexe de sursaut (R. L. Huot et al., 2002; Kalinichev et al., 2002; Liu et al., 2000; Masrour et al., 2018; Wei et al., 2010).

Des altérations du système sérotoninergique ont été observées dans ce modèle dans la période néonatale avec une atténuation de l'expression du récepteur de la sérotonine 1A dans l'hippocampe et le cPFM, et du récepteur de la sérotonine 2A uniquement dans le cPFM. A l'âge adulte, les animaux présentent une réduction de l'activité des neurones sérotoninergiques dans le noyau du raphé et de l'expression des récepteurs 5-HT1A et à l'opposé une augmentation de l'expression de ces récepteurs dans l'amygdale (Bravo et al., 2014a; Ohta et al., 2014; Vilela et al., 2021). Ces altérations pourraient expliquer la plus grande susceptibilité à développer des comportements de types dépressifs évalués par les tests tels que la préférence au sucre, le splash test ou encore la nage forcée (Aisa et al., 2007, 2008; Shu et al., 2015).

Des déficits cognitifs ont été décelés tels qu'une altération de la reconnaissance d'objet ou d'apprentissage dans le test du labyrinthe de Morris, associés à des changements morphologiques dans l'hippocampe comme une réduction du nombre de neurones matures dans la région CA3 de l'hippocampe et de la densité des fibres moussues (Aisa et al., 2007; Banqueri et al., 2021; R. L. Huot et al., 2002; Reshetnikov et al., 2020; Wang et al., 2011).

### *c) Conséquences sur la sensibilité nociceptive*

Dans le modèle SMN, plusieurs études ont permis d'attester d'effets délétères sur le système nociceptifs persistants jusque l'âge adulte tels que des hyper- et hypo-sensibilités viscérales et

somatiques, des déficits de contrôles descendants de la douleur ainsi qu'une neuroinflammation (Coutinho et al., 2002; Juif et al., 2016; Melchior et al., 2018, 2021; Schwaller & Fitzgerald, 2014). Une revue de notre équipe écrite par Melchior et collaborateurs présente un tableau exhaustif recensant les conséquences de la SMN sur le système nociceptif pour différents types de douleur (Melchior et al., 2021). Dans ce manuscrit, nous avons évalué dans l'Article 1 la réponse à des douleurs somatiques (mécanique et thermique chaud), à une douleur inflammatoire dans l'Article 2 et la réponse à une douleur neuropathique dans l'Article 3. La douleur neuropathique sera décrite dans le chapitre 3, ici nous nous restreindrons aux deux autres types de douleur énoncées précédemment.

L'une des premières observations sur la sensibilité nociceptive des animaux ayant subis la SMN concerne une hypersensibilité viscérale démontrée par une réponse viscéromotrice exacerbée à la suite d'une distension colorectale (Coutinho et al., 2002; Moloney et al., 2015). Celle-ci fut associée à plusieurs altérations comme celle de la morphologie du tube digestif et une hausse de l'activité des neurones entériques et semble également être dépendante de l'âge comme le montre une étude de Yi et collaborateurs dans laquelle la proportion de rats éprouvant cette hypersensibilité viscérale diminue en vieillissant (Coutinho et al., 2002; Fuentes & Christianson, 2018; Moloney et al., 2015; Yi et al., 2017). Ce phénotype fait donc de la SMN un modèle de recherche permettant de modéliser le syndrome du côlon irritable, cependant certaines études ont mis en évidence la nécessité d'exposer les animaux à un stress supplémentaire pour arriver à ce phénotype (Fuentes et al., 2016).

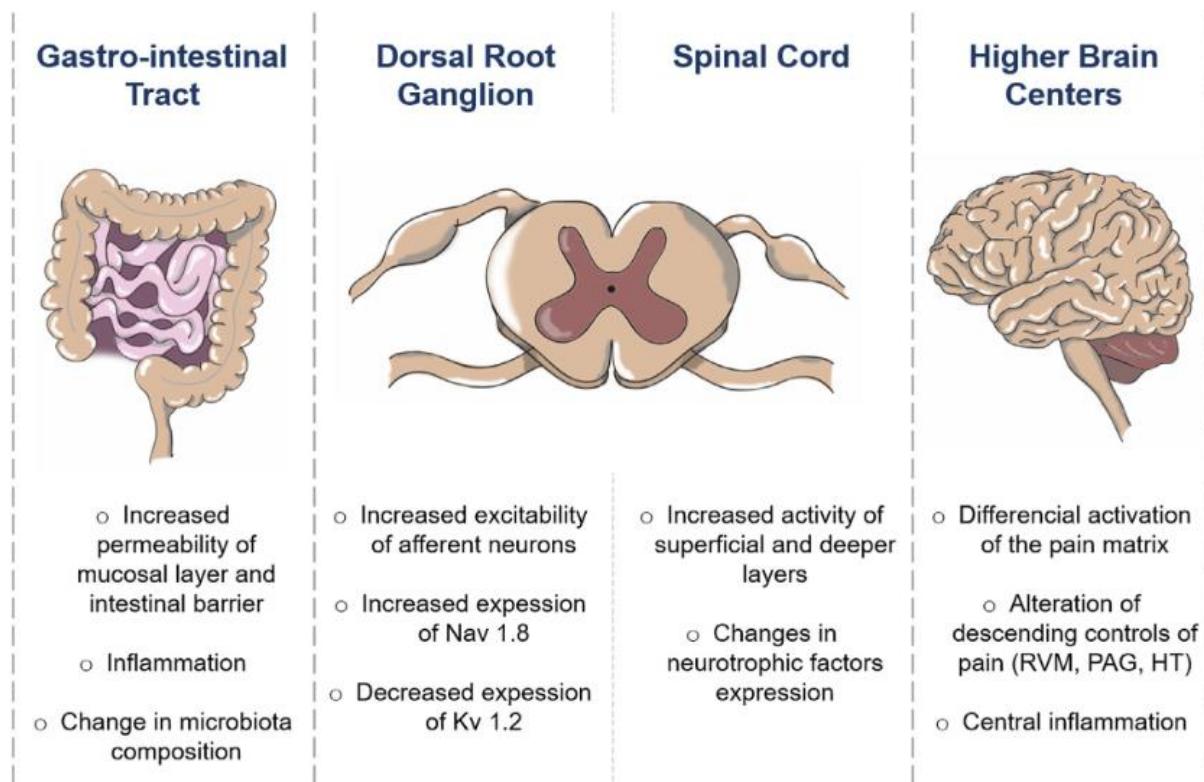
Concernant la sensibilité somatique, notre laboratoire a mis en évidence dès P24 une hypersensibilité mécanique, testée en pince calibrée, thermique au chaud à l'aide du test de Hargreaves et très récemment au froid en test de plaque froide, qui persiste à l'âge adulte (Gazzo et al., 2021a; Gieré et al., 2023; Juif et al., 2016; Melchior et al., 2018). Ces observations ont pu être confirmées par plusieurs autres études chez la souris et le rat, notamment sur d'autre zone du corps comme une allodynie mécanique suite à une stimulation orofaciale (Pierce et al., 2016; Prusator & Greenwood-Van Meerveld, 2016; Takatsuru et al., 2009; Yasuda et al., 2016). Cependant, ces conclusions ne sont pas systématiques. En effet, dans certaines études ces différences de sensibilité sont de l'ordre de l'hyposensibilité, comme une

hyposensibilité thermique au chaud décrite par Coutinho et collaborateurs dans un test de tail flick (Coutinho et al., 2002; Weaver et al., 2007). Enfin dans d'autres études, aucune modification de la sensibilité mécanique ou thermique nociceptive n'est observée (Genty et al., 2018a; Kalinichev et al., 2001; Vilela et al., 2017).

Les animaux ayant subis la SMN présentent également une hypersensibilité à la douleur inflammatoire comme démontré par notre laboratoire suite à des injections de carraghénane sous cutanées (dans la patte arrière) chez le rat (Melchior et al., 2018). La même démonstration fut faite avec des injection de formaline ou d'adjuvant complet de Freund (CFA) suite auxquelles la réponse comportementale des animaux SMN était plus importante que celle du groupe contrôle (Uhelski & Fuchs, 2010; Vilela et al., 2017). Encore une fois, le contraire existe aussi dans la littérature comme l'étude de Genty et collaborateurs qui démontre une absence de différence de sensibilité nociceptive entre le groupe SMN et contrôle suite à une injection de CFA mais également que la SMN atténuait le développement de l'hypersensibilité thermique au chaud liée à l'inflammation et favorisait une récupération plus rapide de la sensibilité mécanique (Genty et al., 2018b).

d) *Altérations du système nociceptif*

Un nombre considérable d'étude a permis de révéler des altérations du système nociceptif en lien avec les hypersensibilités décrites précédemment (**Figure 5**). Le travail de notre équipe décrit dans ce modèle une augmentation de l'expression du canal sodium voltage dépendant Nav1.8 impliqués dans l'excitabilité des nocicepteurs des ganglions de la racine dorsale, des changements dans l'expression des facteurs de croissance (NGF et GDNF) impliqués dans la maturation des fibres C ainsi qu'une augmentation durable de l'expression de l'importateur de chlorure NKCC1 entraînant une modification de l'inhibition GABAergique dans la ME (Gazzo et al., 2021a; Juif et al., 2016). S'ajoute à cela, une diminution de l'expression du canal potassium voltage dépendant Kv1.2 dans les ganglions de la racine dorsale également observée dans ce modèle (J.-L. Luo et al., 2011).



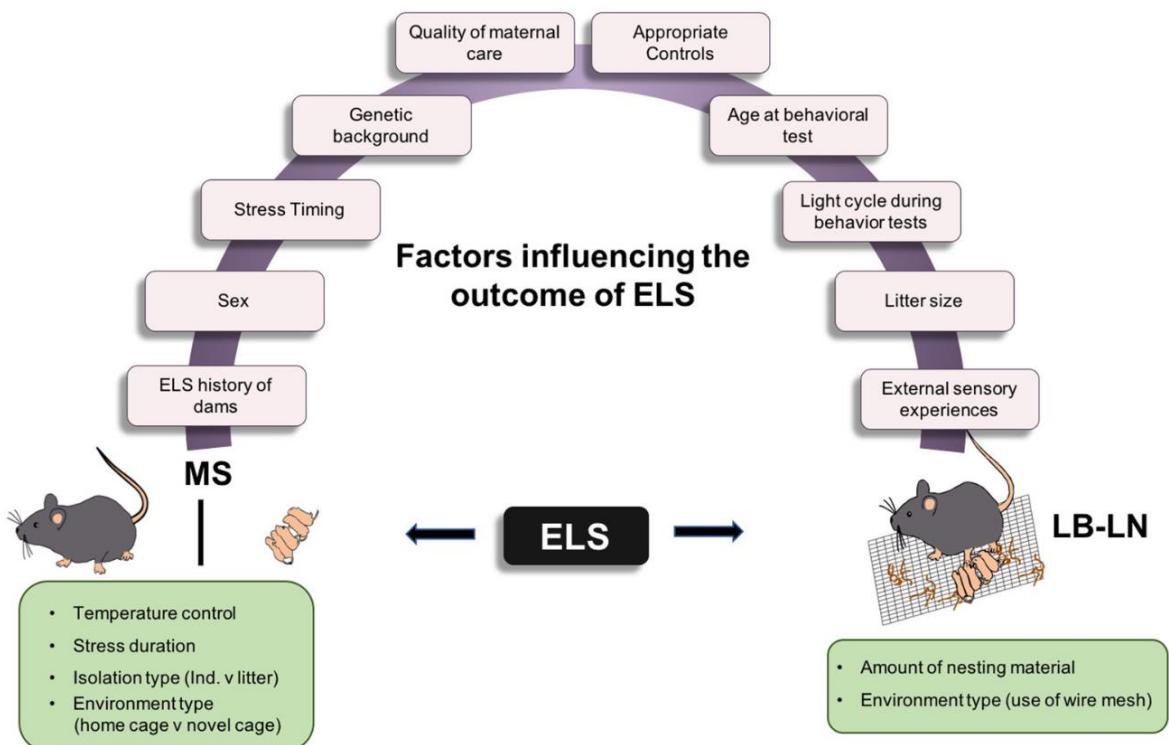
**Figure 5 : Conséquences sur le système nociceptif d'une SMN**  
(Melchior et al., 2021)

Concernant le niveau supra spinal, des changements importants sont observés, notamment une altération de l'activité des circuits et structures de « matrice de la douleur » induite par une augmentation de l'activité du cortex cingulaire antérieur (CCA) (Chung et al., 2007), une hypertrophie de l'amygdale (Koe et al., 2016), une hausse de l'activité des neurones glutamatergiques de l'hippocampe (A. Chen et al., 2017) mais également une altération de la plasticité du cortex préfrontal et somatosensoriel (Chung et al., 2007; Monroy et al., 2010).

Les contrôles descendants de la douleur sont également impactés par la SMN : un déficit des systèmes permettant l'analgésie induite par le stress comme le système ocytocinergique est observé (Melchior et al., 2018). Les contrôles opioïdergiques présentent également un déficit (Kalinichev et al., 2001) associé à une baisse des récepteurs opioïdergiques mu, kappa et delta dans des structures telles que l'amygdale, la médulla rostroventrale et la PAG (Nakamoto et al., 2020).

Enfin, une hypothèse assez récente soutenue par les observations des marqueurs inflammatoires désigne les animaux ayant subi la SMN comme étant dans un état sub-inflammatoire permanent induisant les hypersensibilités nociceptives. En effet, nous avons observé dans la ME de ces animaux, une hausse de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and Cox-2 avec en parallèle une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 conduisant à une plus grande libération des prostaglandines 2 dans la ME (Gazzo et al., 2021a) et dans l'hippocampe (Roque et al., 2016).

Il faut noter cependant que si beaucoup d'études sur ce modèle rapportent des conséquences similaires avec des degrés de gravité différent, on retrouve dans la littérature beaucoup de divergences sur les conséquences de la SMN liées principalement au manque d'homogénéité dans les protocoles de stress mais aussi à des différences d'espèces, de souches ou de période de tests (**Figure 6**) (Murthy & Gould, 2018). C'est pourquoi, nous avons testé deux souches différentes de rat, le Wistar et le Sprague Dawley dans l'Article 1 de ce manuscrit évaluant les conséquences de la SMN à court terme sur le neurodéveloppement et la nociception.



**Figure 6: Résumé des facteurs induisant une variabilité dans les phénotypes des modèles d'adversité précoce chez le rongeur.**

(Murthy & Gould, 2018). Abréviations : (ELS) stress en début de vie, (MS) séparation maternelle, (LB-LN) modèle restreignant la nidification.

## 5. Les réflexes comme marqueurs de maturité du système nerveux

Une évaluation de l'ontogenèse et de la maturation du système nerveux de manière non invasive est possible par l'observation de la mise en place des réflexes pour les fonctions sensori-motrices. Comme énoncé dans le paragraphe 1.a), une atteinte au développement et à la maturation de la connectivité des fibres sensori-motrices par des perturbations pré- ou postnatal peut être observée par un décalage dans la date d'acquisition des réflexes. En effet, le neurodéveloppement suit un modèle séquentiel, prévisible et déterminé chez l'humain comme chez le rongeur (Gerber et al., 2010; Scharf et al., 2016; Heyser, 2003). Pour les rongeurs des tests ont été mis en place afin mesurer en laboratoire l'effet de perturbations telles que des manipulations pharmacologiques, environnementales et génétiques (pour les modèles transgéniques) (Heyser, 2003). A la naissance, le système nerveux des rongeurs est à un stade de développement semblable à celui du fœtus humain lors du début du 3ème trimestre de grossesse (23 à 28 semaines d'aménorrhée) (M. C. White & Wolf, 2004). Si la vitesse de développement n'est pas comparable, les étapes des processus clés du développement sont remarquablement conservées entre les deux espèces (M. C. White & Wolf, 2004; Zeiss, 2021). Le raton naît donc capable d'effectuer certains mouvements semblant aléatoires et désordonnés, les yeux et les canaux auditifs restent fermés jusqu'à environ P15 et la sensibilité tactile n'est pas complètement développée (Heyser, 2003; Zeiss, 2021). La poursuite des processus de développement se fait donc dans la période néonatale dont plusieurs tests développés en laboratoire permettent une évaluation standardisée (Zeiss, 2021; Heyser, 2003; Feather-Schussler & Ferguson, 2016). Quelques exemples sont présentés dans la **Figure 7** et une description plus détaillée des tests est présente dans l'Article 1. On retrouve notamment dans cette liste, la géotaxie négative, l'évitement des falaises, les réactions de sursaut tactiles et acoustiques, les réflexes de redressement en surface ou encore la force d'agrippement.

Développement physique	Force d'agrippement	Evitement de la falaise	Géotaxie négative	Retournement de surface
				
Mesure : • Poids • Ouverture des yeux • Sursaut tactile	Mesure de l'angle de chute pendant l'inclinaison	Mesure de la latence d'évitement du bord	Mesure de la latence du retournement vers le haut	Mesure de la latence du retournement à 180°

**Figure 7 : Exemples de tests évaluant le neurodéveloppement chez le rat.**

## 6. Quand le petit va mal, il vocalise

Grâce à un large panel de tests et paradigmes issus de la recherche sur les modèles animaux de laboratoire et leur comportement, il est depuis longtemps possible de mesurer des comportements très précis chez le rongeur tels que l'anxiété, la dépression, la motivation ou encore les comportements prosociaux qui seront plus détaillés dans le deuxième chapitre. Selon le comportement étudié, il est possible d'utiliser des tests basés sur des réactions provoquées ou spontanées de l'animal.

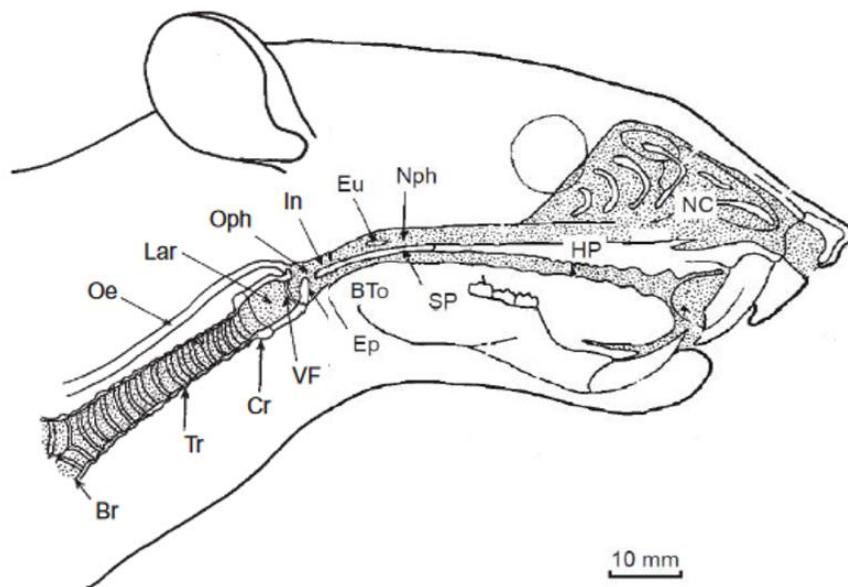
Chez le raton cependant, les tests classiquement utilisés ne sont pas adaptés ou permis à cause de son immaturité morphologique. Rappelons en effet que les ratons restent aveugles, sourds et très peu mobile jusqu'à P15 environ (la séquence temporelle de l'acquisition des réflexes est étudiée dans l'Article 1). Il y a cependant un indicateur valide de l'état affectif qui peut être étudié de manière non invasive chez le raton tout comme chez l'adulte : les vocalisations.

Le texte qui suit ne traite que de l'émission de vocalisations chez le rat et non des autres rongeurs, qui partagent la même faculté mais qui se distinguent de ces derniers par le contexte d'expression et les caractéristiques des vocalisations (Sirotin et al., 2014).

En effet, le rat est capable d'entendre sur des fréquences allant de 250 Hz à 80 kHz à 70 dB (Kelly & Masterton, 1977) et peut émettre des vocalisations dans un spectre allant 2–4 kHz à 70, éventuellement 100 kHz (Brudzynski & Fletcher, 2010; Nitschke, 1982). Une partie de ce spectre de vocalisations appartient au spectre audible de l'humain mais la majorité, supérieure à 20kHz, se situant dans le domaine de l'ultrason et appelée vocalisations ultrasonores, que nous abrègerons par USV pour le terme anglais *ultrasonic vocalisations*.

Les vocalisations dans le spectre de l'audible et les USV diffèrent dans la façon dont elles sont amorcées. Dans l'audible, le rat use de ses cordes vocales pour les émettre en les contractant alors que les USV sont dues à un phénomène de sifflet généré par le passage du flux expiratoire contraint dans le larynx et modulé par la contraction des muscles l'entourant (**Figure 8**) (Roberts, 1975).

La majorité des sons émis dans l'ultrasons sont purs, de fréquence simple mais avec des variations en amplitude et en fréquence rapides.



**Figure 8 : Description de l'anatomie du larynx chez le rat**

Voies respiratoires supérieures du rat en coupe sagittale. Abbréviations : (Br) bronches, (BTo) base de la langue, (Cr) cartilage cricoïde du larynx, (Ep) epiglottis, (Eu) ouverture des tubes d'Eustache, (HP) palais, (In) choanæ, (Lar) larynx, (NC) cavité nasale, (NPh) nasopharynx, (Oe) oesophage, (Oph) orthopharynx, (SP) voile du palais, (Tr) trachée, (VF) cordes vocales

D'après (Brudzynski & Fletcher, 2010).

Ces vocalisations vont être émises dans des contextes bien particuliers et on distingue trois types d'USV couramment décrites en fonction de l'âge du rat, de son état affectif et des conditions environnementales (Portfors, 2007). On observe donc chez le raton un type d'USV émises autour de 40kHz dites de détresse, chez le jeune adulte et l'adulte deux types, une première catégorie à environ 22kHz associée à des états affectifs négatifs et la seconde 50kHz, associée à des états affectifs positifs (Allin & Banks, 1972; Noirot, 1968; Portfors, 2007).

*a) Vocalisations chez le raton*

Chez le raton, on observe un type de vocalisations centrées autour de 40khz généralement désigné comme vocalisations de détresse pendant les 20 premiers jours de vie jusqu'au sevrage. Une fois le sevrage passé, ce pattern change vers des vocalisations typiques de l'adulte de manière assez abrupt (Portfors, 2007).

Durant la période néonatale, les ratons démontrent une variété riche d'appels différents majoritairement dans le spectre ultrasonore mais également dans l'audible, en effet les premiers jours de vie ceux-ci vocalisent peu et surtout dans l'audible, passé P3, les vocalisations sont essentiellement dans le registre de l'ultrason (Noirot, 1968). Elles se situent à une fréquence de 40-50 kHz (pouvant aller de 35 à 60 kHz, selon les études et l'âge des ratons testés) et sont courtes pouvant aller de 20 ms à 300 ms (Brudzynski et al., 1999). Dans cette étude que nous venons de citer, Brudzynski et son équipe décrivent que les ratons âgés de 10 à 17 jours sont capables de vocaliser en modulant énormément la fréquence des sons, avec une fréquence minimale aussi basse que 1,9 kHz et une maximale aussi élevée que 125 kHz.

Les vocalisations de détresse surviennent lors de situation de danger ou aversive pour le raton, telle qu'une séparation du nid ou de la mère, lors d'exposition à des conditions provoquant une hypothermie, ou encore à des odeurs associées à un choc électrique par conditionnement (Allin & Banks, 1972; Blumberg & Alberts, 1990; Hofer et al., 2001; Weber et al., 2000)

La communication des mères avec leur progéniture est considérée comme la forme phylogénétique la plus ancienne de communication chez les rats et chez tous les mammifères (Newman, 2007). Ces vocalisations provoquent chez les femelles allaitantes des comportements de recherches du petit pour l'amener au nid en étant guidée vers lui par les vocalisations qu'il émet, ou encore pour le déloger lorsqu'elles s'assoient ou marchent sur ce dernier (Allin & Banks, 1972; N. R. White et al., 1992). Elles augmentent également les comportements de soins comme le toilettage de la zone anogénitale, le retour de la mère vers le nid ou son arrangement et induisent même une hausse de l'hormone prolactine chez elle (Brouette-Lahlou et al., 1992; Hashimoto et al., 2001).

Par toutes ces démonstrations, les USV dites de détresse semblent donc de bons indicateurs valides d'état d'anxiété chez le raton qui de plus peuvent être modulées par l'administration d'agents pharmacologiques (Gardner, 1985) ce qui les rends pertinentes non seulement pour l'étude des mécanismes neurobiologiques, mais aussi pour la neuropharmacologie et la psychopharmacologie (Schwarting & Wöhr, 2012). Diverses études ont ainsi démontré que l'administration d'anxiolytique ou d'antidépresseurs avant un test d'isolation de la mère ou du nid avait pour effet de réduire significativement le nombre et la durée d'USV émises par le raton testé (Hodgson et al., 2008; Olivier et al., 1998; Winslow & Insel, 1991). A l'inverse, l'administration d'un agent anxiogène tel que le pentylenetetrazol, un antagoniste du complexe macromoléculaire liant les benzodiazépine du récepteur GABA-A, à des ratons âgés de 10 jours élicite une augmentation de l'émission d'USV alors qu'ils se trouvent dans la cage d'hébergement (Carden et al., 1993).

On peut également citer d'autres paramètres liés à l'environnement pouvant influencer le nombre d'USV émises tels que la présence de la mère (même dans des conditions d'hypothermie légère) et un estomac plein qui les diminuent ou à l'inverse une isolation d'un raton dans une cage sans litière qui les augmente plus qu'une cage avec litière (Hofer, 1996; Oswalt & Meier, 1975). Enfin, un dernier effet contre intuitif sur l'émission d'USV est celui de la potentialisation maternelle rapporté par Hofer et son équipe en 1998. Dans cette étude, l'émission d'USV par les ratons suite à deux tests d'isolation successifs était plus importante si entre les deux isolations le raton était exposé à un bref contact avec la mère alors même que

le seul contact avec la mère est plutôt connu comme ayant un effet anxiolytique (Hofer et al., 1998).

L'étude des USV par l'observation du nombre de vocalisations émises, de leur fréquence et autres paramètres permet un aperçu de l'état affectif émotionnel chez le nouveau-né et a été considérablement intégré dans de nombreux domaines d'étude. Une comparaison des USV entre la souche de rat Sprague Dawley et Wistar sous l'effet de la séparation maternelle néonatale est décrite dans l'Article n°1.

On en conclut ici, par l'observation de l'ensemble des études menées chez le nouveau-né, d'un rôle important des vocalisations qui sera principalement associé à la protection de l'intégrité de l'individu et donc de l'espèce, depuis sa naissance.

#### *b) Vocalisations chez l'adulte*

Une fois le sevrage passé, le jeune rat adopte les mêmes vocalisations retrouvées chez l'adulte, certaines dans le registre de l'audible et les autres majoritaires sont des USV. On observe donc des USV autour de 22kHz en réponse à des situations aversives qui remplaceront les USV de détresses du raton à 40kHz et celles à 50kHz en réponse des situations d'états affectifs positifs. Ce changement assez brut dans les caractéristiques des USV, notamment le passage de 40kHz à 22kHz, s'expliquent chez les spécialistes par les modifications morphologiques chez le raton au moment du sevrage, à savoir le passage à une alimentation solide et une taille et un poids plus important, qui influencent et altèrent la respiration (Dutschmann et al., 2009) et la production des sifflements par le larynx (Riede, 2013).

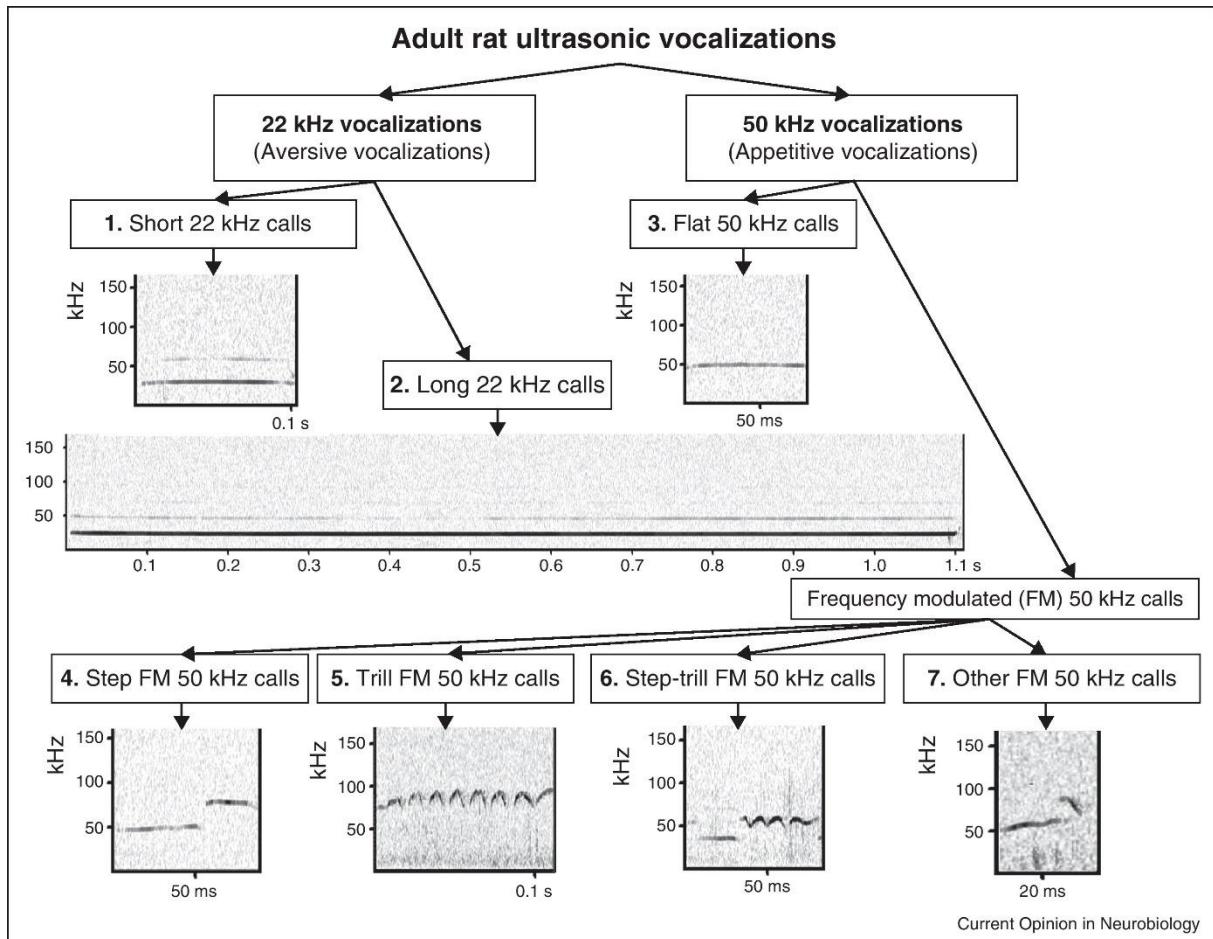
En réponse à des situations aversives ou stressantes le rat adulte émet des vocalisations dont la fréquence se situe autour de 22kHz (**Figure 9**). Elles sont observées dans beaucoup d'interactions sociales comme par exemple lorsqu'un rat est battu lors l'établissement de la dominance (Takahashi et al., 1983; Thomas et al., 1983). Cependant les USV les plus décrites de ce type restent les vocalisations d'alarme en réponses à la présence d'un prédateur (ou de son odeur) qui en plus d'enclencher un comportement de défense, élicite de long appels

stéréotypées et répétées par un rat lorsqu'il le détecte dans le but de communiquer l'avertissement à l'ensemble du groupe (Blanchard et al., 1990, 1991; Dielenberg & McGregor, 2001; Litvin et al., 2007). Ce comportement est donc une méthode de défense sociale contre les prédateurs (Brudzynski, 2021). Les vocalisations de ce type sont également émises en cas de situation aversive ou surprenantes comme un bruit ou contact tactile soudain, un choc électrique sur une partie du corps (pied ou queue selon les tests) et même lors d'un contact avec un expérimentateur inconnu (Blanchard et al., 1986; Jourdan et al., 1995; Kaltwasser, 1990; Knapp & Pohorecky, 1995). Enfin d'autres conditions très expérimentales ont provoqué des USV à 22kHz chez des rats adultes comme un sevrage après une exposition (parfois chronique) à la morphine, à la cocaïne ou encore à l'alcool (Kalinichev & Holtzman, 2003; Mutschler & Miczek, 1998; A. M. Williams et al., 2012). Si les USV sont utilisées comme un indicateur valide d'anxiété c'est aussi car la quantité d'USV émise est corrélée à l'intensité de la stimulation aversive comme le démontre Wöhr et son équipe dans une étude de conditionnement de peur (Wöhr et al., 2005).

Un autre type d'USV est indicatif d'états affectifs positifs chez le rat. En effet, des USV émises dans des fréquences environnant les 50kHz ont été identifiées en réponse à des stimuli gratifiants comme le jeu chez les rats juvéniles (Burgdorf et al., 2008; Knutson et al., 1998), l'anticipation de prise de nourriture palatable (Buck et al., 2014), d'agents addictifs (Knutson et al., 1999), ou encore lors de comportements sexuels (**Figure 9**) (T. K. McIntosh et al., 1978; T. K. McIntosh & Barfield, 1980). De plus, ces USV sont émises à la suite de stimulations intracérébrales du système de récompense (Burgdorf et al., 2000). Ainsi, les USV de 50kHz sont acceptées comme mesure reflétant un état émotionnel positif chez le rat (Brudzynski, 2015; Schwarting, 2023).

Enfin, une précision concernant les vocalisations chez le rat apporté par Brudzynski dans une récente revue : ces dernières ne doivent pas être comparés au langage chez l'Homme car c'est une fonction supportée par des mécanismes neuronaux et fonctions cognitives complexes non présents chez le rongeur (Brudzynski, 2021). Cependant, on peut les comparer aux phonations humaines dites non verbales tels que les rires, les gémissements, les pleurs ou encore les cris. N'ayant pas de contenu lexical, ce type de vocalisations inarticulées sont des réflexes évolutifs

équivalents à d'autres vocalisations de mammifères générées par des mécanismes limbiques sous-corticaux (Mainka et al., 2019).



**Figure 9 : Classification des vocalisations ultrasonores chez le rat adulte.**

Les sonogrammes exemplaires montrent la structure acoustique des vocalisations ultrasonores. (Brudzynski, 2013).

### c) Substrat neurologique

La production d'USV de 22 kHz est déclenchée par l'activation glutamatergique de fibres cholinergiques résidant dans le tronc cérébral dans le noyau tegmental latérodorsal. Celles-ci projettent dans les régions antérieure et pré-optique de l'hypothalamus, ainsi que dans le septum. La sécrétion d'acétylcholine dans ces régions, que Brudzynski appelle « bande de vocalisation cholinceptive médiale », est décrite comme à l'origine de l'émission d'USV de 22kHz (Brudzynski, 2013).

Par ailleurs l'émission d'USV de 50kHz est induite par l'activité de la voie dopaminergique mésolimbique. Il a par exemple été montré que la stimulation électrique de l'aire tegmentale ventrale induit la production d'USV de 50kHz chez le rat (Burgdorf et al., 2007). L'activité des fibres dopaminergique ascendantes résidant dans l'aire tegmentale ventrale et la sécrétion subséquente de dopamine dans le nucleus accumbens et le septum semblent entraîner l'émission d'USV de 50kHz et l'état affectif positif qui leur ai associé (Brudzynski, 2013).

B. Chapitre 2 : L'empathie à la douleur dans un contexte d'adversité

précoce

Le travail de recherche durant la thèse concernant l'empathie à la douleur a abouti à un article en cours de rédaction (cf. ARTICLE 2) ainsi qu'à la revue suivante présentée en annexe :

**Brik Y.** et Melchior M., (2022) La question de l'empathie à la douleur et de l'impact de l'environnement néonatal. *Douleur et Analgésie*, 35, 188-195

1. L'empathie et ses différentes composantes

“ On ne peut comprendre les gens que si on les sent en soi-même. ” John Steinbeck, *À l'est d'Éden* (1952).

Si l'empathie est un processus social conservé à travers l'évolution et au cœur des interactions de groupe de beaucoup d'espèces (Preston & de Waal, 2002), le terme lui est assez récent. En effet, la notion d'empathie est familière à chacun mais reste souvent confondue avec la sympathie ou encore la compassion. La distinction entre ces termes a fait l'objet de discussion aussi bien dans le domaine philosophique que psychologique. Le philosophe allemand Robert Vischer introduit dans sa thèse en 1873 une première réflexion significative sur le concept d'*Einfühlung* dans le domaine artistique, qui signifie « se mettre à la place de » et qui sera repris et intégré plus tard par Theodore Lipps dans le domaine de la psychologie puis traduit en français par le terme « empathie ». Aujourd'hui le concept est étudié dans son aspect évolutif et motivationnel, dans les comportements prosociaux mais également sur l'origine du substrat neurobiologique qui le sous-tend et qui semble être conservé à travers les espèces. Dans la suite de ce chapitre, nous resterons principalement centrés sur l'empathie à la douleur.

La définition exacte de l'empathie reste sans consensus particulier et peut être changeante en fonction du domaine d'étude (De Vignemont & Singer, 2006). En se restreignant au domaine des neurosciences, on définit l'empathie comme étant une réponse affective à la perception directe ou à l'imagination de l'état affectif de l'autre (Singer & Lamm, 2009). Cela sous-entend

plusieurs étapes qui sont résumées de la manière suivante lorsqu'on s'intéresse à ses bases neuronales (De Vignemont & Singer, 2006) :

- Se trouver dans un état affectif particulier
- Cet état est identique à l'état affectif d'une autre personne
- Cet état est suscité par l'observation ou l'imagination de l'état affectif de cette autre personne
- Comprendre que l'autre personne est la source de son propre état affectif et non soi-même
- Agir en fonction de la situation, souvent dans la motivation d'apporter de l'aide

Cette dernière étape de réponse comportementale d'aide peut également être l'apport de réconfort, et consolation donc de sympathie qui est plus particulièrement utilisé pour parler de l'Homme, ce qui explique la confusion fréquente entre sympathie et empathie.

On distingue dans le détail de ces étapes une première composante importante qui est celle de la **résonance** ou **contagion émotionnelle** qui est la faculté de répliquer de manière innée les émotions d'autrui, aussi nommée **résonance affective**. Cette contagion émotionnelle est décrite par plusieurs auteurs comme le substrat premier de la réponse empathique (J. Panksepp & Panksepp, 2013; Preston & de Waal, 2002) qu'on retrouve dans plusieurs espèces pourvues de fonctions cognitives de différent niveau de complexité, aussi bien chez l'Homme, les primates non humains que les rongeurs dont on détaillera plus spécifiquement le cas dans la deuxième partie du chapitre.

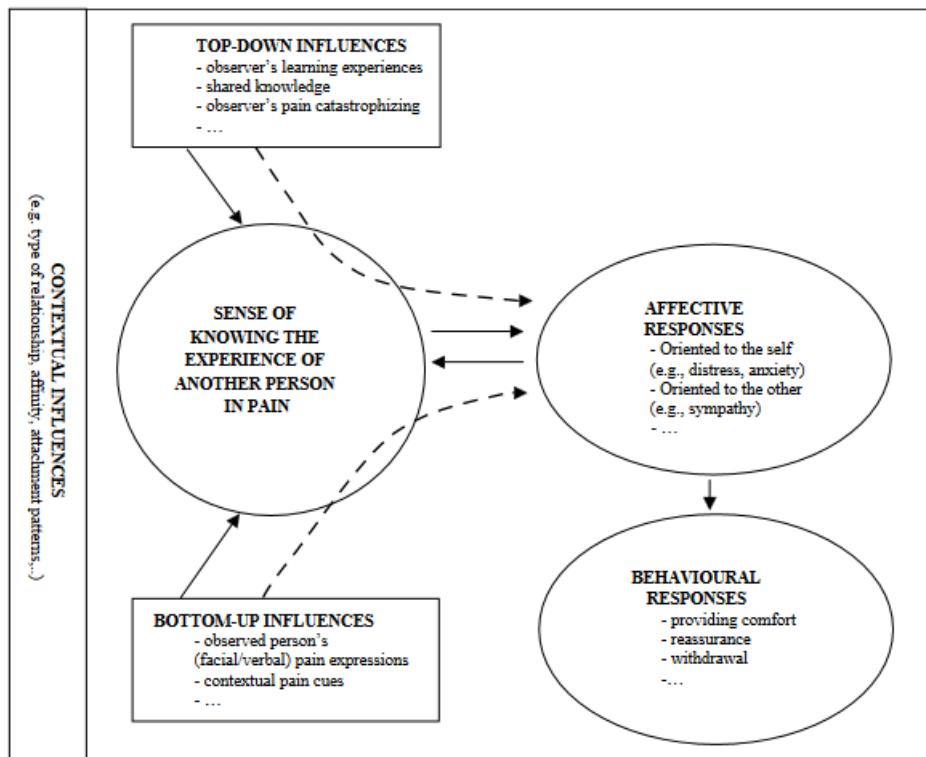
Cette étape est donc involontaire et inconsciente comme le concluent Bernhardt et Singer dans leur revue en 2012 par l'observation de plusieurs études en imagerie fonctionnelle démontrant une base commune de réseaux neuronaux s'activant lors de l'expérience empathique qui sont semblables à ceux s'activant lorsqu'on subit soi-même le stimulus douloureux ou qu'on ressent soi-même l'émotion testée dans l'étude (Benuzzi et al., 2008; Bernhardt & Singer, 2012; Singer et al., 2004). Dans ces études, les chercheurs ont recours à différents modèles de tests pour étudier l'empathie comme des films, photos et images

d'expression faciale de personne souffrante, de corps en situation douloureuse ou encore de suggestions qu'un proche est en train de subir une stimulation douloureuse.

On observait alors chez les sujets testés des activations des aires corticales suivantes : cortex cingulaire antérieur et médian, insula antérieure, gyrus frontal inférieur et le cervelet en réponses à ces images ou suggestions. L'activation de ces réseaux est donc semblable à celle d'un sujet expérimentant lui-même l'émotion ou le stimulus. C'est donc sur la base de ces démonstrations et observations que la théorie de la **représentation partagée** lors de l'expérience empathique émergea.

Pour l'empathie à la douleur, une étude d'imagerie fonctionnelle par Singer et ses collaborateurs en 2004 apportent plus de précisions en montrant que l'imagination d'un proche en souffrance active des aires associées à la composante affective de la douleur et non pas l'entièreté de la matrice de la douleur c'est-à-dire, **l'insula antérieure bilatérale** ainsi que le **CCA** (Singer et al., 2004).

Vient ensuite la part **cognitive** associée à l'empathie, qui entend comprendre le contexte et intellectualiser les émotions de l'autre. Celle-ci est suivie de près par la **déconnexion émotionnelle** qui est la régulation de la réponse empathique par la séparation claire de ses propres émotions de celle d'autrui. Cette déconnexion est liée aux fonctions exécutives et contrôles « top-down » qui permettent à l'individu, grâce à ces expériences passées et son savoir de se dissocier de l'autre mais aussi de moduler sa réponse empathique (**Figure 10**) (Goubert et al., 2005).



**Figure 10 : Processus cognitifs liés à l'empathie à la douleur.**

(Goubert et al., 2005).

Enfin l'aspect motivationnel conclut la réponse empathique généralement par un comportement prosocial d'aide ou de consolation mais dans certains cas cela peut également se manifester par un évitement de la personne ou de la situation afin de se soustraire du stress induit par la contagion émotionnelle (Goubert et al., 2005).

Autres conclusions notables de ces études sur l'empathie : le degré de proximité entre les personnes concernées et le genre modulent également la réponse empathique. L'intensité de l'activation des aires corticales n'est pas la même si le sujet de l'étude imagine un partenaire romantique ou un proche dans une situation douloureuse par rapport à un total étranger (Singer et al., 2004).

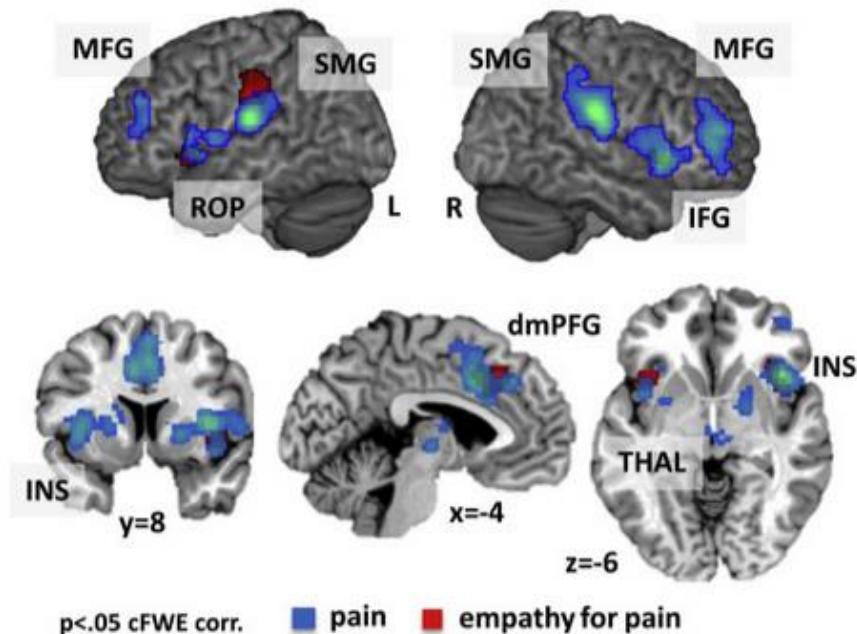
Enfin, concernant l'empathie à la douleur, notre propre rapport à la douleur peut également moduler cette réponse empathique et à l'inverse l'empathie ressentie pour autrui peut moduler notre réponse à la douleur (Godinho et al., 2012; X. Li et al., 2020). En effet, des individus ayant eux-mêmes une grande sensibilité à la douleur attribuent des notes plus importantes lorsqu'il s'agit d'évaluer la douleur d'autrui ainsi que l'aspect désagréable qui y est associé (X. Li et al., 2020). Cela est aussi vrai dans le sens inverse comme le démontre une étude de Godinho et al., dans laquelle la réponse à la douleur évaluée en laboratoire à l'aide de tests nociceptifs chez des sujet sains est plus importante après avoir observé la douleur d'autrui (Godinho et al., 2012). Ce phénomène a été qualifié **d'hyperalgésie compassionnelle**. Pour conclure sur ces spécificités liées à nos expériences, l'expérience même de la douleur par le passé n'est pas une condition prérequis à l'empathie. Une remarquable étude de l'empathie à la douleur chez des personnes atteintes du rare syndrome d'insensibilité congénitale à la douleur rapporte la même activation en imagerie par résonance magnétique fonctionnelle du CCA médian et de l'insula antérieure lorsqu'elles observaient la douleur d'autrui que celle observée chez des sujets sains (Danziger et al., 2009). Cela signifie également que la résonnance émotionnelle n'est pas une condition *sine qua non* à l'empathie et souligne en outre le rôle important de la prise de perspective émotionnelle et de compréhension des sentiments dans les interactions sociales chez l'Homme. L'empathie à la douleur reste donc possible sans ce principe de contagion émotionnelle.

## 2. Aires corticales et substrat neurologique associés

### a) Aires corticales associées à l'empathie à la douleur

Nous avons donc vu que l'empathie à la douleur peut être segmentée en plusieurs étapes recrutant différentes fonctions et aires cérébrales. Concernant l'empathie à la douleur il s'agit principalement d'un recrutement des aires communes aux aires activées par l'expérience douloureuse telles que le cortex insulaire antérieur et le CCA ( **Figure 11**) (Timmers et al., 2018; Kogler et al., 2020).

## Pain and empathy for pain (main effects)



**Figure 11 : Différentes activations dans le cerveau lors de l'expérience de la douleur et de l'empathie à la douleur**

Imagerie par résonance magnétique fonctionnelle. Abbréviations, gyrus préfrontal dorso-médian : dmPFG, gyrus frontal inférieur : IFG, insula : INS, gyrus supramarginal : SMG, gyrus frontal moyen : MFG, lobule rolandique : ROP, thalamus = THAL. (Kogler et al., 2020)

### b) Rôle de l'ocytocine

L'ocytocine, présentée précédemment dans cette introduction, est pour rappel connue pour son rôle physiologique dans l'accouchement et la lactation, joue aussi un rôle dans la modulation du stress et la régulation de la réponse à la douleur. Chez les mammifères, elle intervient également dans les interactions et le renforcement des liens sociaux (Lee et al., 2009; H. E. Ross & Young, 2009). Enfin chez l'Homme plus spécifiquement, des études ont démontré qu'elle augmentait la confiance, la générosité et certains aspects de la cognition sociale (Bethlehem et al., 2014; Domes et al., 2007; Guastella et al., 2010; Kosfeld et al., 2005). De manière empirique, elle a également été démontrée comme étant impliquée dans la

réponse empathique. La recherche sur l'implication de l'ocytocine dans les processus empathique rapportent une augmentation de cette dernière mesurée dans le sang lors de son expérience (Barraza & Zak, 2009). Cette corrélation entre l'augmentation de sa libération et la réponse empathique était plus importante chez les femmes que les hommes.

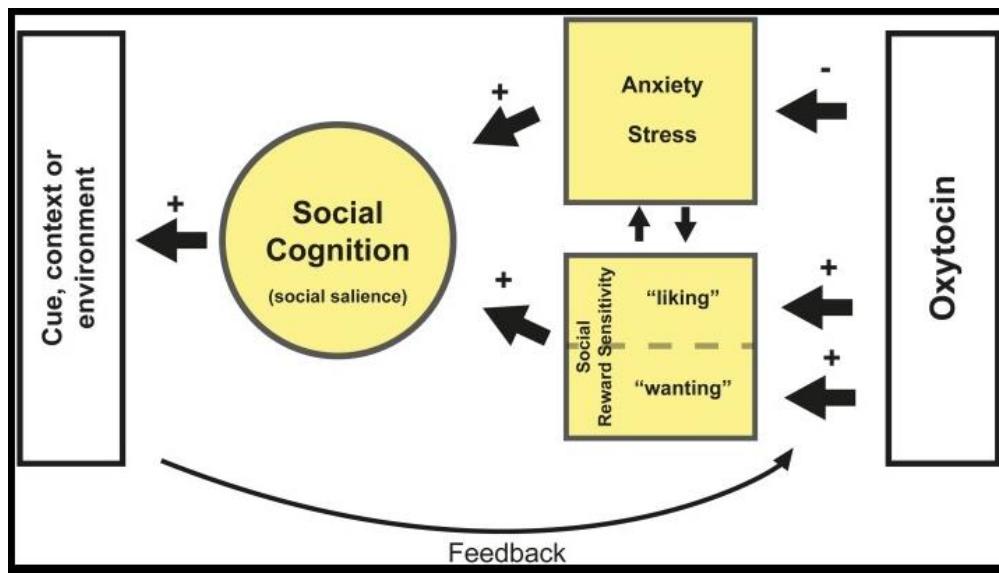
Abu Akel et ses collaborateurs menèrent une étude en 2015 d'imagerie fonctionnelle chez des sujets sains où l'on demandait au sujet d'imaginer sur une échelle une douleur ressentie soit par lui-même, soit par une autre personne à partir de photographies montrant des situations douloureuses (Abu-Akel et al., 2015). Ils démontrent ainsi que des injections intranasales d'ocytocine avaient pour effet d'augmenter la réponse empathique à la douleur comparées à un placebo lorsque le sujet adopté la perspective d'une autre personne et non la sienne. Singer et ses collaborateurs en 2008 ont voulu tester cette même hypothèse cette fois uniquement en observant l'activation des aires cérébrales associées à l'empathie (dans cette étude, l'insula antérieure) chez des sujets sains observant leur partenaire romantique recevant une stimulation douloureuse sur la main (Singer et al., 2008). Ils en conclurent que l'activation de ces aires n'étaient pas augmentées par les injections d'ocytocine par comparaison avec le placebo. La seconde partie de l'étude démontrent que ces activations n'étaient pas non plus corrélées positivement avec les comportements prosociaux des participants testés via un jeu de confiance et de coopération économique.

D'autres études comme celle de Bartz et son équipe en 2010 puis 2019 amenèrent plus de précisions en démontrant que l'ocytocine n'augmentait pas les réponses empathiques chez tous les sujets sains (hommes et femmes) mais uniquement chez les hommes dotés d'un score plus haut que la moyenne au questionnaire de quotient du spectre autistique (Bartz et al., 2010, 2019). Il s'agit d'individu sans troubles cognitifs mais qui éprouvent plus de difficultés dans les interactions sociales. Ces résultats confirment que l'ocytocine améliore sélectivement les aptitudes sociales des individus moins compétents sur le plan social, mais a peu d'effet sur les individus suffisamment compétents.

L'ocytocine semble donc être un médiateur au moins partiel de la réponse empathique avec un rôle assez nuancé par le genre et les compétences sociales d'un individu (**Figure 12**).

Ces résultats sont également soutenus par des études menées sur des modèles animaux en laboratoire montrant que l'administration d'ocytocine chez des rats hébergés seuls augmentait leur comportement prosociaux d'aide et que ces comportements étaient associés à une activation des neurones oxytocinergiques qui projettent vers le CCA (Yamagishi, Lee, et al., 2020; Yamagishi, Okada, et al., 2020). La même conclusion est apportée par une étude chez le campagnol des prairies qui est une espèce de rongeur possédant la particularité assez rare d'être monogame (Burkett et al., 2016; Sue Carter et al., 1995). Chez ce dernier, l'injection d'un antagoniste des récepteurs de l'ocytocine dans le CCA spécifiquement avant un test où l'animal est exposé à un partenaire très stressé supprimait les comportements de consolation qu'il présente normalement.

On conclut de ces démonstrations empiriques chez l'Homme et l'animal que le cortex insulaire antérieur, le CCA ainsi que les récepteurs oxytocinergiques de cette structure sont des éléments clés et nécessaires au processus empathique.



**Figure 12 : Résumé du rôle de l'ocytocine sur le cerveau social.**

(Bethlehem et al., 2014)

### 3. Une possible altération de l'empathie à la douleur par l'environnement néonatale

Cette habileté à partager les sentiments d'autrui et à comprendre ses états mentaux est d'autant plus importante lorsqu'il s'agit de l'empathie à douleur, étant donné son rôle fondamental de protection de l'intégrité physique. Cette faculté se développant dès les premières années de vie d'un individu (Tousignant et al., 2017), il est intéressant de s'intéresser aux causes et phénomènes pouvant perturber son développement durant la période néonatale.

L'empathie se développant en début de vie, il est possible que le stress et l'adversité vécus pendant cette période vulnérable affectent les capacités d'empathie, idée corroborée dans quelques études. Par exemple, il a été constaté que les enfants nés prématuré présentent des difficultés à reconnaître les émotions faciales à l'âge de trois ans (Witt et al., 2014). De plus, aux âges de deux et sept ans, les enfants nés prématurés et grands prématurés semblent rencontrer des difficultés d'ordre socio-émotionnelles qui incluent l'empathie évaluée par les échelles d'Infant-Toddler Social and Emotional Assessment et le Kids Empathy Development Scale (C. Campbell et al., 2015; Spittle et al., 2009). À l'âge adulte, les personnes exposées à des traumatismes dans l'enfance présentent des scores plus faibles d'empathie affective, mesurés par le Multifaceted Empathy Test et l'Empathy Quotient (Grimm et al., 2017).

### 4. Apport des modèles de laboratoires

Comme énoncé plus haut, la base ou la forme primaire de l'empathie est la contagion émotionnelle. Elle est conservée à travers les espèces et favorise la survie du groupe en facilitant la communication d'informations importantes sur des dangers potentiels et en provoquant des comportements prosociaux envers les congénères (J. Panksepp & Panksepp, 2013). En laboratoire, les modèles de rongeurs permettent donc d'apporter des réponses concernant le substrat neurobiologique sous tendant cette fonction et d'étudier l'impact de l'adversité précoce sur son développement. Dans la suite de cet énoncé nous nous focaliserons

sur les différents paradigmes de tests qui ont été développés et qui permettent d'évaluer le comportement de contagion émotionnelle chez le rongeur.

a) *Modèles de tests de contagion émotionnelle*

L'une des premières observations chez le rat de comportement interprété comme étant de la « sympathie » a été reporté en 1959 par Church R.M dans un article où il décrit la réponse émotionnelle des rats face à un congénère douloureux dans une étude de conditionnement émotionnel (Church, 1959). Dans cette étude, un rat était mis dans compartiment adjacent à celui (tout à fait visible) d'un autre rat subissant un choc électrique. Face à la réaction de peur et de douleur du second rat, les rats testés montraient des comportements d'anxiété exacerbés qui se traduisaient par une diminution du nombre d'utilisations d'un levier pour obtenir de la nourriture alors qu'ils étaient en restriction alimentaire. Cette réaction observable sur une période de plus de 10 jours, interprétée comme de la sympathie par les chercheurs, était encore plus intense chez des rats ayant eux-mêmes subis ces chocs pendant la session de test.

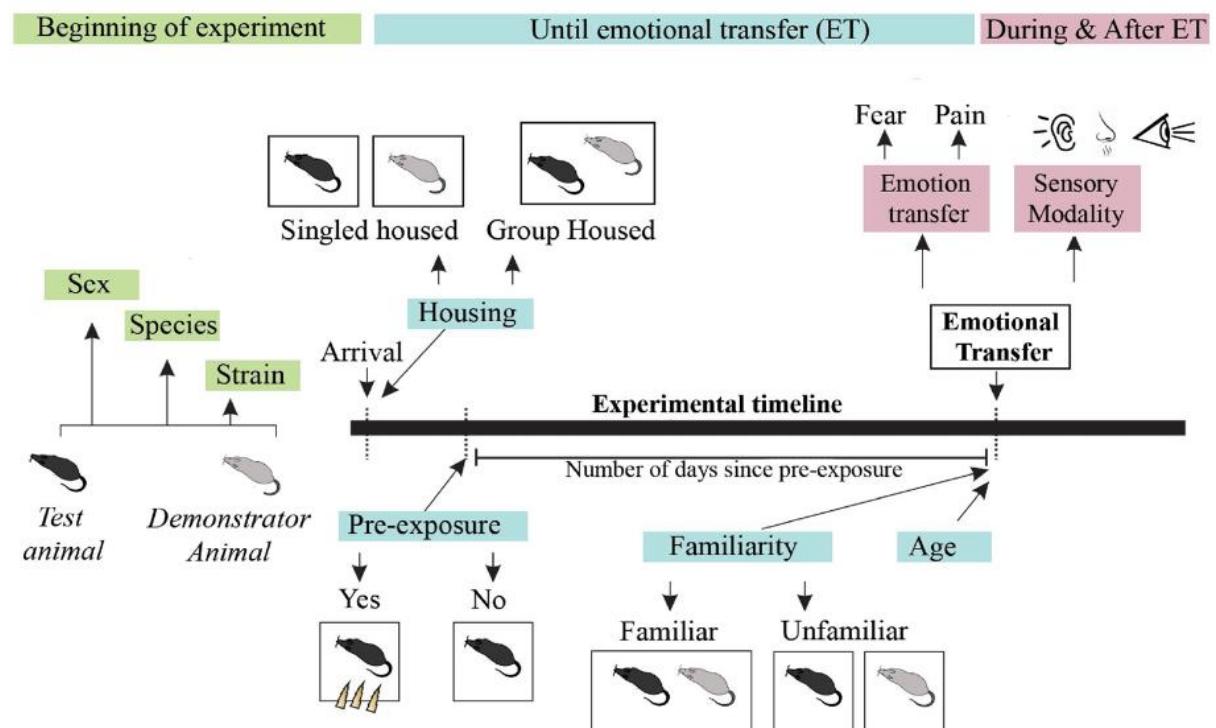
Il existe aujourd'hui dans la littérature beaucoup d'autres exemples de contagion émotionnelle principalement pour des émotions fortes telles que la peur et la douleur qui s'articulent autour d'une même base de test, à laquelle on ajoute des modifications en fonctions de l'objet d'étude (**Figure 13**) (Hernandez-Lallement et al., 2022). Cette base est **l'interaction d'une dyade d'animaux** dans laquelle un animal est désigné comme l'animal **démonstrateur** (AD) chez lequel on va provoquer une émotion forte et le second comme **l'observateur** (AO) à qui l'émotion est transmise (Hernandez-Lallement et al., 2022).

A partir de cela, on peut modifier et faire varier certains paramètres concernant les animaux étudiés avant le test de contagion qui sont :

- Le sexe
- La souche
- Le mode d'hébergement (seul ou en groupe)
- La familiarité des animaux (compagnons de cage ou étrangers)
- L'âge

Puis pendant le test :

- L'émotion provoquée chez l'AD (souvent peur ou douleur) et le type de stimulus
- La durée de l'interaction : de 30 min jusqu'à plusieurs jours (co-hébergement)
- L'utilisation ou non d'une préexposition au stimulus de test
- La modalité sensorielle par laquelle se fait le transfert (ouïe, vue, odorat ou toutes à la fois)
- Le(s) test(s) rendant compte de la contagion émotionnelle chez l'AO



**Figure 13 : Protocole typique de la mise en place d'un test de contagion émotionnelle.**

(Hernandez-Lallement et al., 2022).

Les études sur la contagion de la douleur usant de ce type de protocole rapportent un effet remarquable chez l'AO qui est une **modification de la sensibilité nociceptive** à la suite du test de contagion. Des études démontrent une augmentation significative de la réponse nociceptive d'un AO suite à une interaction avec un AD ayant subis une douleur aiguë inflammatoire induite par du venin d'abeille, du CFA ou encore de formaline (Langford et al., 2006; C. L. Li et al., 2018; M. L. Smith et al., 2016). En s'intéressant à l'effet d'une exposition plus longue comme un co-hébergement, d'autres études rapportent que les animaux hébergés dans les mêmes pièces que d'autres subissant un sevrage à l'alcool ou à la morphine développent une hyperalgésie concordante (M. L. Smith et al., 2016).

De manière semblable, l'hébergement d'animaux avec des congénères endurant une douleur chronique suite à une neuropathie induite par une constriction chronique du nerf sciatique provoquent chez ces derniers de l'anxiété ainsi qu'une hypernociception (Baptista-de-Souza et al., 2015).

Il est à noter, que dans toutes les études précédemment citées, l'effet de contagion de la douleur n'était possible que sur des animaux familiers entre eux (i.e. héberger dans la même cage durant au moins deux semaines).

b) Classification des comportements observables

Ces modèles de tests ont permis de catégoriser différents types de comportement chez le rongeur, selon qu'on étudie celui de l'AD ou de l'AO, présentés et catégorisés par Panksepp et Panksepp dans leur revue de 2013 (J. Panksepp & Panksepp, 2013). On observe premièrement comme énoncé plus haut la **contagion émotionnelle** chez l'AO avec une augmentation de la réponse nociceptive après une interaction avec un AD douloureux ou au contraire un phénomène nommé **analgesie sociale** (*social analgesia*) lorsque la réponse diminue. Après l'interaction, l'AD lui montre une diminution de comportements nociceptifs appelé **effet tampon** (*social buffering*) (Figure 14).

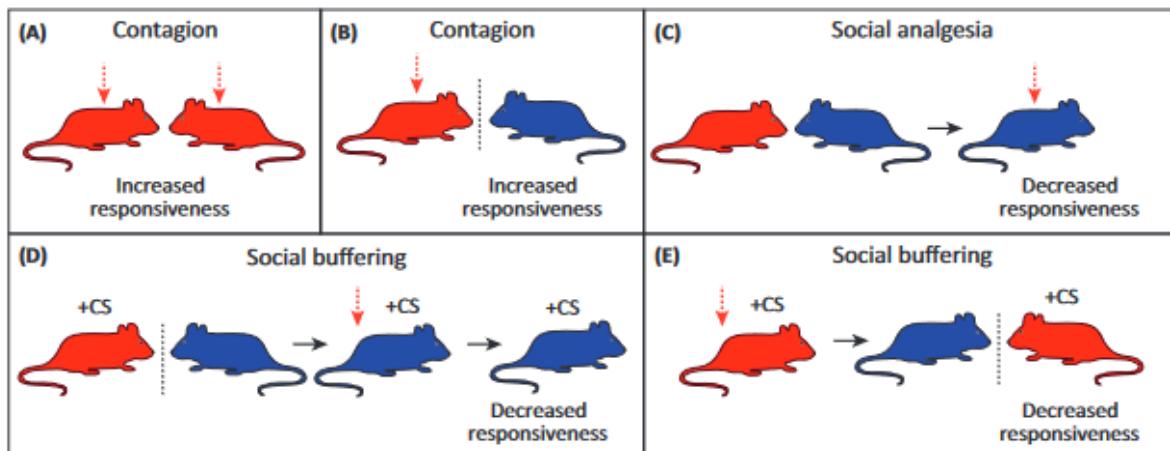


Figure 14 : Différents effets de la contagion émotionnelle chez le rongeur.

D'après (J. Panksepp & Panksepp, 2013)

c) Modalités sensorielles associées et réseaux neuronaux

Des études menées en optogénétique en laboratoire chez la souris ont également confirmé que la contagion de la douleur chez des souris (rôle de l'AO), à la suite d'une interaction avec une souris présentant des comportements nociceptifs induits par une injection de CFA,

induisait l'activation de neurones du CCA et de plusieurs cibles en aval, notamment le noyau accumbens. Cette projection directe du CCA vers le noyau accumbens a été mise en évidence par un traçage viral monosynaptique (virus de la rage modifié). L'inhibition bidirectionnelle de cette projection empêcha la contagion de la douleur chez l'AO. Ce même protocole d'optogénétique démontra que cette activation et projection du CCA vers le noyau accumbens est également requise pour le transfert social de l'analgésie (social analgesia) entre deux souris souffrante, dont une seule avait reçu un traitement antalgique (M. L. Smith et al., 2021).

Certaines se sont plus concentrées sur les modalités sensorielles nécessaires à cette contagion. Il en ressort que l'expérience de la contagion émotionnelle sollicite plusieurs modalités sensorielles chez le rongeur qui vont toutes communiquer une information au sujet de l'observateur.

En effet, la démonstration fut faite en soumettant un AO à i) l'odeur d'une litière d'un AD ayant subis un stimulus douloureux ou un stress aigue, ii) l'enregistrement d'USVs d'un AD effrayé ou douloureux, ou une interaction depuis deux compartiments en plastiques accolés permettant le passage du son mais pas de l'odeur ou la vue et iii) une interaction depuis deux compartiments en plastiques accolés permettant la vue mais pas l'ouïe ou l'odorat.

L'odorat, l'ouïe, et la vue seuls peuvent tous communiquer une information concernant l'état émotionnel de l'animal mais la contagion émotionnelle reste plus importante lorsque les trois modalités sont réunies et que les animaux ont une interaction sociale dans la même cage sans aucunes séparation (Hernandez-Lallement et al., 2022).

#### *d) Adversité précoce et contagion émotionnelle*

Il existe dans la littérature quelques exemples de l'évaluation de l'adversité précoce sur ces fonctions comme celle de Kikusui et collaborateurs démontrant que la contagion à la douleur n'était pas observée chez des souris ayant subis un sevrage anticipé à P14 lorsqu'elles interagissaient avec des AD ayant subis une injection intrapéritonéale d'acide acétique à 0.9% (Kikusui & Mori, 2009). Dans leur test, lorsque deux souris du groupe contrôle étaient injectées

puis mise en présence l'une de l'autre, la contagion émotionnelle augmentait leur comportement nociceptif à toutes les deux, ce qui n'était pas le cas pour les souris sevrées précocement.

Une étude de Laviola et collaborateurs fit une démonstration similaire sur des souris engendrées par une mère ayant subi un stress sévère par l'exposition à des niveaux anormaux de corticostérone (80 µg/mL) dans l'eau des biberons durant la première semaine postnatale (Laviola et al., 2021). Dans cette étude, les souris, dont la mère était stressée, une fois adulte présentaient également un déficit de contagion émotionnelle dans un test similaire à celui décrit précédemment où les souris recevaient une injection sur la patte arrière de formaline (1%).

Sur la base de ces données cliniques montrant un potentiel impact de l'adversité précoce sur les processus liés à l'empathie à la douleur et la possibilité de le modéliser chez l'animal, nous avons souhaité évaluer l'impact de la SMN sur la contagion de la douleur dans l'Article 2 de ce manuscrit.

## C. Chapitre 3 : Cas particulier de la douleur neuropathique

Dans la dernière partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact chez l'adulte de l'adversité précoce comme facteur aggravant sur le développement d'un type de douleur particulier : la douleur neuropathique.

### 1. Définitions

Nous avions rappelé dans le chapitre 1 la définition de la douleur par l'IASP. Or des distinctions sont faites entre les types de douleur qui sont catégorisées de la manière suivante : i) la **douleur nociceptive** résulte d'une activation des nocicepteurs suite à une lésion réelle ou probable dans les tissus (hors tissus nerveux) ; ii) la **douleur nociplastique** est engendrée par une altération de la nociception sans preuve évidente d'une lésion tissulaire réelle ou menaçante et entraînant l'activation des nocicepteurs ou de preuve d'une maladie ou d'une lésion du système somatosensoriel à l'origine de la douleur ; iii) la **douleur neuropathique** est causée par une lésion ou une maladie du système nerveux somatosensoriel (central ou périphérique) (« Terminology | International Association for the Study of Pain », s. d.). Cette dernière peut provoquer des douleurs spontanées continues ou paroxystiques, des allodynies et hyperalgésies mécaniques et thermiques et même des anomalies sensorielles (dysesthésie ou paresthésie). Quand les douleurs neuropathiques apparaissent à la suite de maladies pouvant endommager le système nerveux (e.g. la sclérose en plaque, le cancer, le diabète, le SIDA, l'herpès, les lésions de la moelle épinière, des maladies auto-immunes) mais aussi à la suite de chirurgie (Jaggi et al., 2011) et persistent plus de trois mois, elles appartiennent alors à la catégorie de **douleurs chroniques** (Colloca et al., 2017; Jaggi et al., 2011).

La douleur chronique, se traduit par des manifestations douloureuses récurrentes ou persistantes durant trois mois ou plus et compte des catégories d'étiologie différentes. La douleur chronique primaire est une maladie à part entière due à l'atteinte d'une ou plusieurs régions anatomiques (Treede et al., 2019) et la douleur chronique secondaire se manifeste en association avec des maladies ou des problèmes sous-jacents (e.g. l'arthrose, diabète,

lombalgie). Quelles soient d'origine primaire ou secondaire, les douleurs chroniques neuropathiques sont difficiles à traiter car résistantes aux traitements analgésiques classiquement utilisés en clinique. De plus elles sont souvent accompagnées de comorbidités anxiо-dépressives telles qu'une susceptibilité plus grande de développer des troubles anxieux, dépressifs, des troubles du sommeil ou encore un isolement social (Colloca et al., 2017).

L'estimation de la population atteinte de douleur chronique en Europe est d'environ 20% selon l'IASP et l'étude épidémiologique de Breivik et collaborateurs (Breivik et al., 2006). Concernant les douleurs chroniques neuropathiques en France, la part de la population atteinte est de presque 7% (Bouhassira et al., 2008). Parmi les facteurs de risques associés au développement de douleur chronique, on retrouve l'âge, la population âgée étant la plus sensible, le sexe avec une prévalence chez les femmes, la sédentarité, les troubles anxiо-dépressifs mais également d'autres facteurs sociodémographiques ou cliniques (Burke et al., 2017; van Hecke et al., 2013). L'adversité précoce telle que nous l'avons définie auparavant fait également partie de ces facteurs de risques (Antoniou et al., 2023; Burke et al., 2017; Davis et al., 2005; Maatta et al., 2019).

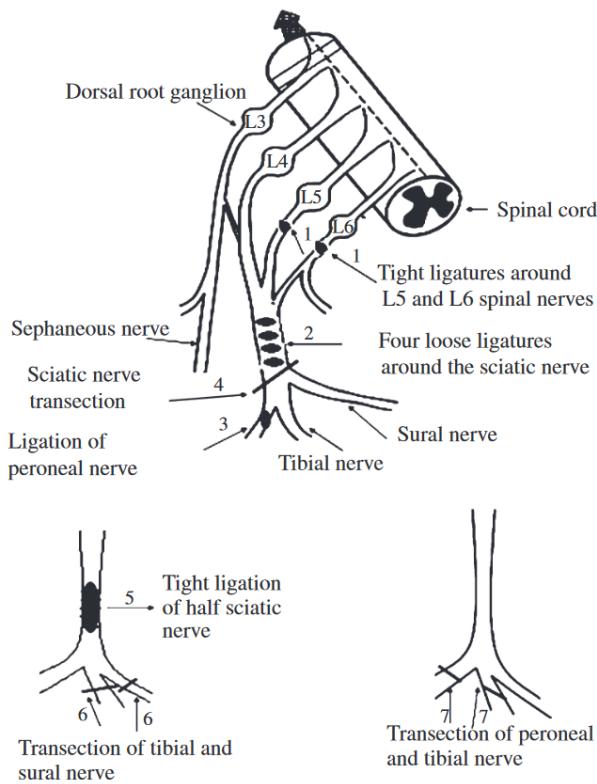
## 2. L'adversité précoce, facteur de risque dans la douleur chronique

En effet, comme démontré dans les chapitres précédents, les données cliniques suggèrent que les événements adverse survenus au début de vie sont des facteurs de risque pour le développement de pathologies neurologiques à l'âge adulte, affectant les fonctions cognitives et émotionnelles et la sensibilité à la douleur (Fitzgerald, 2005; McEwen, 2008; McLaughlin et al., 2019; Melchior et al., 2021; Moster et al., 2008). C'est également le cas pour la douleur chronique : de multiples études et méta-analyse ont corrélé l'adversité précoce avec un plus grand risque de développer une douleur chronique à l'âge adulte en comparaison avec la population générale (Antoniou et al., 2023; Burke et al., 2017; Davis et al., 2005). Par exemple, un grand nombre de patients souffrant de migraines ou de syndromes du côlon irritable rapportent des antécédents de maltraitance et traumas dans l'enfance (C. A. Ross, 2005; Tietjen et al., 2016). Une étude de Stickley et collaborateurs a démontré une association significative entre les abus physiques dans l'enfance et des douleurs chroniques lombaires à

l'âge adulte, ainsi qu'une association entre un grand nombre d'événements adverses dans l'enfance et un risque plus élevé de douleur chronique de différents types (arthrose, douleur musculaire, migraine) à l'âge adulte (Stickley et al., 2015).

### 3. Modèles de douleur neuropathique

La douleur neuropathique étant pharmaco-résistante, plusieurs modèles en laboratoire chez le rongeur ont été développés. Dans ces modèles, la neuropathie est induite par des lésions du système nerveux (e.g. trigéminales ou spinales), des traitements anti-cancéreux connus pour induire des lésions nerveuses ou encore par des neuropathies suite à un diabète (modélisable chez le rongeur) (Jaggi et al., 2011). Parmi toutes ces possibilités, une catégorie de modèles repose sur des lésions de nerfs en périphéries comme une compression ou lésion du nerf sciatique et sont présentés dans la **Figure 15** (Barrot, 2012; Jaggi et al., 2011). Les revues de Barrot et collaborateurs et Jaggi et collaborateurs présentent toutes deux un recensement remarquable des différents modèles existants, leurs variantes ainsi que les avantages et inconvénients de chacun d'entre eux (Barrot, 2012; Jaggi et al., 2011). Pour le présent manuscrit, nous présenteront uniquement le modèle de douleur neuropathique utilisé dans la dernière étude qui concerne l'Article 3.



**Figure 15 : Illustration des différents modèles de neuropathie par compression ou lésion du nerf sciatique**

(1) Ligature des nerfs spinaux, (2) constriction chronique du nerf spinal par ligatures ou pose d'un manchon de polyéthylène (cuff), (3) ligature du nerf péroné, (4) axotomie par transsection du nerf sciatique, (5) ligature partielle du nerf sciatique, (6) transsection des nerfs tibial et sural, (7) lésion partielle du nerf sciatique par transsection des nerfs du péroné et du tibia  
(Jaggi *et al.*, 2011)

Un premier modèle de compression du nerf sciatique « chronic constriction injury » (CCI) développé par Bennett et Xie consiste à effectuer trois à quatre ligatures lâches autour du nerf sciatique (Barrot, 2012; Bennett & Xie, 1988). Les animaux opérés présentent à la suite de cette opération des allodynies et hyperalgésies thermiques et mécaniques durant au moins 7 semaines ainsi que des comportements de douleurs tels que des léchages excessifs de la patte opérée ou un évitement de l'utilisation de la patte pouvant aller jusqu'au boitement. La variante utilisée dans notre étude est celle de la constriction chronique du nerf sciatique par la pose d'un manchon de polyéthylène appelé « cuff » en anglais développé en premier par Mosconi et Kruger, puis adapté à la souris dans notre laboratoire (Benbouzid et al., 2008; Mosconi & Kruger, 1996). A la suite de la chirurgie chez le rat, (décrise dans le

matériels et méthodes de l’Article 3) et pendant environ 40 jours les animaux développent une hypersensibilité thermique au froid et mécanique (Aouad et al., 2014).

Tout modèle animal possède des limites et les modèles de neuropathie ne permettent pas une translation avec la douleur chronique neuropathique chez l’humain car l’aspect « chronique » n’est pas présent chez les rongeurs, rats ou souris. En effet, dans le modèle du cuff, l’hypersensibilité se résorbe au bout de 40 jours, dans d’autres comme le CCI les symptômes persistent jusque 6 semaines ou encore 3 mois pour le modèle « Spared nerve injury » (Jaggi et al., 2011). Néanmoins, ils ont permis de mettre en évidence un grand nombre des mécanismes à l’origine de ces douleurs donnant lieu à toute une littérature sur le sujet, dont la revue de Campbell et Meyer (J. N. Campbell & Meyer, 2006). Même si la douleur induite par la neuropathie n’est pas « chronique » comparativement à ce qui est observé cliniquement chez l’Homme, dans la plupart des modèles, des comportements de type anxieux apparaissent en général 4 semaines après la chirurgie, et dans certains cas des comportements de type dépressifs sont observables au bout de 6 à 8 semaines selon les modèles et l’espèce étudiée (Yalcin et al., 2014).

#### 4. Conséquences anxiо-dépressives dans les modèles de laboratoire

Les travaux de notre laboratoire menés chez la souris ont mis en évidence dans ce modèle de cuff un développement de comportements de type anxieux au bout de 4 semaines après la chirurgie évalué dans de multiples tests comme le labyrinthe en croix, le test de suspension de la queue ou encore d’interaction sociale (Benbouzid et al., 2008; Yalcin et al., 2011). Puis au bout de 6 à 8 semaines, les souris présentaient en plus des comportements de type dépressifs mis en évidence dans des tests de nage forcée, de « light-dark box » ou encore de « novelty suppressed feeding ». Même si plusieurs recherches précliniques ont démontré une corrélation positive entre la douleur neuropathique et les comportements anxiо-dépressifs, ce constat n’est pas systématique (Fonseca-Rodrigues et al., 2021; Hestehave et al., 2020; Kremer et al., 2021). Des données non publiées de notre laboratoire testant l’effet du cuff sur le

comportement de type anxieux et dépressif chez le rat Sprague Dawley ne montrent aucun développement de ces deux comportements dans cette espèce à la suite de la chirurgie.

Concernant l'adversité précoce, des études se sont penchées sur son impact sur le développement des douleurs neuropathiques ainsi que les comportements de type anxi-dépressif associés. Une étude menée sur un modèle de SMN (3h/jour de P1 à P21) chez la souris montre qu'à la suite d'une neuropathie induite par CCI, l'allodynie mécanique mesurée en Von Frey et l'allodynie thermique au froid mesurée avec un test à l'acétone, étaient plus grave chez les souris du groupe SMN (Mizoguchi et al., 2019). Un autre exemple, toujours chez la souris montre qu'une SMN (6 h/jour de P15 à P21) suivie d'un isolement social (animaux logés individuellement jusqu'à la fin de l'étude) augmentent également l'hypersensibilité mécanique, testée en Von Frey, et thermique au chaud, testée avec le test du Plantar, dans ce groupe d'animaux (Nishinaka et al., 2015). A notre connaissance, il n'y a pas d'étude évaluant l'effet de la SMN chez le rat dans le développement de la neuropathie induite par la pose d'un cuff. Plusieurs études chez le rat montrent que la souche Sprague Dawley ne présente pas de comorbidité anxi-dépressives ou de troubles cognitifs à la suite ce type de neuropathie (lésion du nerf sciatic) (Hestehave et al., 2020; Hubbard et al., 2015; Kontinen et al., 1999; Okun et al., 2016).

A partir de ces différentes données de la littérature montrant l'adversité précoce chez l'Homme et les modèles de laboratoires comme un facteur aggravant dans le développement de douleur chronique et neuropathique, nous avons émis l'hypothèse que la SMN induirait des symptômes sensoriels, émotionnels et cognitifs aggravés dans le modèle du cuff chez le rat Sprague Dawley. L'évaluation de cette hypothèse est l'objet du dernier article de ce travail de thèse, l'Article 3.

## Objectifs de la thèse

## II. Objectifs de la thèse

Durant ce travail de recherche, notre objectif fut d'évaluer les conséquences comportementales et émotionnelles à court et long terme du stress de SMN en prenant en compte la douleur et ses différentes composantes. Ainsi les travaux de ma thèse se sont regroupés autour de trois objectifs distincts :

→ Caractériser les effets de la SMN sur le **neurodéveloppement** en se basant sur une batterie de test évaluant l'acquisition des réflexes sensori-moteurs, l'émission de vocalisation ultrasonore (USV) des rats en réponse à une isolation de la mère et les réponses nociceptives dans la période néonatale afin de caractériser le commencement de l'hypersensibilité nociceptive présente dans le modèle de SMN à l'âge adulte. Toutes ces évaluations ont été effectuées sur deux souches de rat afin de vérifier si certaines différences observées dans notre laboratoire et dans la littérature sont dues à un effet de souche ou à des différences de protocoles de SMN. Les résultats sont présentés dans l'Article 1 (prêt à être soumis) de ce manuscrit :

**Brik Y.**, Gazzo G, Poisbeau P., Melchior M., (2024) Consequences of neonatal maternal separation on the development of sensorimotor functions and pain sensation: A comparison between Sprague Dawley and Wistar rat.

→ Evaluer à l'âge adulte les conséquences de la SMN sur la **contagion émotionnelle à la douleur**, qui est la fonction cognitive chez l'animal se rapprochant le plus de l'empathie à la douleur, et les comportements prosociaux associés. Dans cette évaluation, nous étudions l'impact de la SMN en testant l'effet d'une contagion de la douleur entre deux rats familiers sur leur réponse nociceptive ainsi que les comportements prosociaux dits de « réconfort ». Ces travaux ont donné lieu à l'Article 2, dans la partie résultat ainsi qu'une revue sur l'empathie chez l'Homme et l'animal présente dans ce manuscrit.

**Brik Y.**, Poisbeau P., Melchior M., The impact of neonatal maternal separation on contagion of pain in Sprague Dawley rat

**Brik Y.** et Melchior M., (2022) La question de l'empathie à la douleur et de l'impact de l'environnement néonatal. *Douleur et Analgésie*, 35, 188-195

→ Evaluer l'impact de la SMN sur le développement d'une **douleur neuropathique et les comorbidités associées** chez des rats adultes. L'adversité précoce étant un facteur de risque dans le développement de la douleur chronique chez l'Homme, nous avons voulu évaluer le développement d'une neuropathie induite par une constriction du nerf sciatique par la pose d'un manchon en polyéthylène, modèle du « cuff ». Notre hypothèse étant que la SMN induirait une aggravation des hypersensibilités induites par la neuropathie ainsi qu'une apparition de comorbidités telles que des comportements de type anxiо-dépressifs ou des déficits cognitifs qui ne se développent pas chez le rat avec ce modèle. Les résultats sont présentés dans l'Article 3 du manuscrit.

**Brik Y.**, Poisbeau P., Melchior M., Impact of neonatal maternal separation on the development of neuropathic pain induced by chronic constriction of the sciatic nerve in later life in rats

# Résultats

### III. Résultats

Article 1 : Conséquences de la séparation maternelle néonatale sur le développement des fonctions sensorimotrices et la sensibilité à la douleur : Comparaison entre les souches de rat Sprague Dawley et Wistar.

Les premiers travaux de cette thèse viennent compléter l'étude de la Dr Gazzo Géraldine lors de son doctorat au sein de notre équipe qui visait à raffiner et compléter la caractérisation phénotypique précoce du modèle de séparation maternelle néonatale (SMN) chez le rat.

Le modèle de SMN que nous utilisons au sein du laboratoire a été décrit comme induisant des troubles comportementaux et cognitifs ainsi que des perturbations du système nociceptif et des réponses à la douleur à l'âge adulte. Dans cet article nous avons caractérisé les conséquences précoces de la SMN sur l'émergence des fonctions sensorimotrices en nous basant sur les réflexes moteurs et les réponses comportementales. Nous avons ensuite évalué les conséquences sur le système nociceptif en évaluant la sensibilité à la douleur (mécanique et thermique) au cours de la période néonatale afin de déterminer la date d'apparition de l'hypersensibilité nociceptive présente chez l'adulte dans ce modèle.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence un impact de la SMN différent selon la souche, induisant une émergence plus précoce de certains réflexes sensori-moteurs chez le rat Sprague Dawley contre une absence d'effet ou une tendance au retard chez le Wistar. Concernant les USVs induites par l'isolement, nous avons démontré un nombre USVs plus important chez le rat Wistar comparés au Sprague Dawley, mais pas d'effet de la SMN sur ce comportement. A propos du système nociceptif, nous avons observé que le rat Wistar avait une sensibilité mécanique nociceptive plus importante que le Sprague Dawley et que la SMN a induit une hypersensibilité mécanique uniquement après le sevrage chez les deux souches.

Compte tenu des divergences de résultats dans la littérature concernant l'effet de la SMN sur le neurodéveloppement, j'ai complété cette étude en y ajoutant la comparaison avec la souche de rat Sprague Dawley pour tous les tests effectués. Ayant acquis l'expertise et les outils nécessaires à l'analyse des vocalisations USVs chez le rat, j'ai pu ajouter à l'étude une autre réponse comportementale qui est celle des USVs du raton en réponse à une isolation du nid. Cet article est prêt à être soumis.

# Consequences of neonatal maternal separation on the development of sensorimotor functions and pain: A comparison between Sprague Dawley and Wistar rat

Yasmine Brik<sup>1\*</sup>, Géraldine Gazzo<sup>\*</sup>, Pierrick Poisbeau <sup>1\*</sup> and Meggane Melchior <sup>1\*</sup>

Centre National de la recherche Scientifique et Université de Strasbourg, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (CNRS UMR 7364) – 12 rue Goethe, 67000, Strasbourg, France

**\*Corresponding author:** Meggane Melchior, PhD, CNRS UMR 7364, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Research group “Life adversity and pain” – 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France. Email: [mmelchior@unistra.fr](mailto:mmelchior@unistra.fr)

**Key words:** early life stress; neurodevelopment; neonatal maternal separation; developmental milestones; pain.

## **Highlights:**

- The impact of neonatal maternal separation (NMS) differs depending on the strain
- NMS advanced the emergence of certain reflexes in Sprague Dawley pups
- NMS had only a tendency to retarding the emergence of some reflexes in Wistar
- In an isolation test Wistar pups vocalize more than Sprague Dawley pups
- NMS induced a mechanical hypersensitivity after weaning in both tested strains

**Abstract:** Clinical data indicate that early life stress can affect the development of the nervous system, inducing a cascade of neurobiological changes associated with sensory, emotional, and cognitive deficits in adulthood. Neonatal maternal separation (NMS), (3h/day from P2 to P12) in rodents has been described as a model of neonatal stress inducing behavioral and cognitive disorders as well as disturbances of the nociceptive system and pain responses at adulthood. We sought to characterize the early consequences of NMS on the emergence of sensorimotor functions and isolation-induced ultrasonic vocalizations during the neonatal period. As motor reflexes and behavioral responses are good markers of the connectivity and maturation of fibers, they can be used to study the maturation of the nervous system in a non-invasive way. We then evaluated the consequences on the nociceptive system by assessing pain sensitivity at different dates during the neonatal period to determine when nociceptive hypersensitivity occurs. Considering the divergences of results in the literature, we compared two rat strains: Sprague Dawley and Wistar. Results showed a different effect of NMS on strains, inducing an earlier emergence of certain sensory-motor reflexes in Sprague Dawley rats while it had no effect or a tendency to retarding them in Wistar. Regarding isolation-induced ultrasonic vocalisations, Wistar pups vocalized more than Sprague Dawley, but the analysis revealed no

effect of the NMS. Concerning the impacts on the nociceptive system, Wistar pups had a lower mechanical nociceptive threshold compared to Sprague Dawley, NMS induced mechanical hypersensitivity only after weaning in both strains.

## **Introduction**

The neonatal development of sensorimotor functions is characterized by the progressive appearance of specific reflexes at critical time windows. In humans, various neurodevelopmental disorders or environmental factors such as early life stress (ELS) can affect the proper emergence of these reflexes, as it happens during a period of maturation.

Indeed, the emergence of sensorimotor reflexes depends on proper neurodevelopment, including timely migration, myelination and synapse formation (Nguyen et al., 2017), mainly occurring before birth but also continuing after during the neonatal period. Studies on rodent demonstrated that although the timing of myelination is regionally dependent, it is underway in motor and sensory brain regions around P10 and peaks around P20, as shown with diffusion tensor imaging (Bockhorst et al., 2008) and myelin basic protein staining studies (Downes & Mullins, 2014). Synapse density also increases and peaks during the second and third postnatal weeks, conjointly with astrogenesis (Semple et al., 2013). In particular, the nociceptive system continues its maturation after birth as an important reorganization of A-fibers innervation happens from superficial layers I and II to the deeper layers of the dorsal horn, (Beggs et al., 2002) and C-type fibers are not completely functional before P10 (Fitzgerald, 1988; Jennings & Fitzgerald, 1998). During this neonatal period, inhibitory processing in the spinal cord mediated by GABA A and glycine receptors undergoes critical developmental changes affecting thus synapse selectivity (Baccei & Fitzgerald, 2004; Keller et al., 2001) and chloride homeostasis (Li et al., 2002; Rivera et al., 1999; Stil et al., 2009). Finally, the endogenous modulatory controls of pain, such as the opioidergic and oxytocinergic systems, also mature after birth during the first three weeks of life (Beland & Fitzgerald, 2001; Choy & Watkins, 1979; Schwaller et al., 2016).

At birth, the immaturity of the rat brain is similar to that of a human neonate born extremely preterm (23-28 weeks gestation) and the maturation of its cerebral cortex is considered to be

equivalent to that of a full-term newborn at postnatal day 12-13 (Romijn et al., 1991). A rat model of neonatal maternal separation (NMS), consisting of 3 hours of separation from P2 to P12, is commonly used to assess the effects of ELS during this period of extreme vulnerability. The impact of NMS has mostly been studied in the long term (i.e. after weaning or at adulthood). Data from the literature suggests that it has long term effects on neurobiological and behavioral aspects (Aisa et al., 2007; R. L. Huot et al., 2002; Kalinichev et al., 2002). Indeed, repeated NMS induces social deficits (Kikusui & Mori, 2009), anxiety-like symptoms and an abnormal response to stress characterized by hyper-reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (Ladd et al., 2004; Plotsky & Meaney, 1993). Alteration of cognitive functions were also observed in this model as it induced important learning impairments in the novel object recognition test and in the Morris water maze in Wistar rats (Aisa et al., 2007). NMS has also been shown to alter pain sensitivity in the developing brain (Melchior et al., 2021), inducing nociceptive alterations that persist into adulthood, mainly visceral (Coutinho et al., 2002) and somatic hyperalgesia associated with reduced inhibitory controls (Juif et al., 2016; Melchior et al., 2018). However, an immediate response of the pup to maternal separation is the production of ultrasonic vocalizations (USVs) around 40-kHz to induce maternal retrieval (Allin & Banks, 1972; Hofer et al., 2001; Noirot, 1968). USVs in rats have an important role in the communication of emotional states and information as they emit them in particular conditions. Long USVs around 22-kHz are associated with a negative experience or emotional state such as an inter-male fighting, an encounter with a predator or a painful stimuli, while short USVs emitted around 50-kHz may be associated with positive ones like social play or sexual approach (Blanchard et al., 1990; Borta et al., 2006; Brudzynski, 2021; Knutson et al., 2002, 2002; White et al., 1990). However, pups before weaning are only able to vocalize around 40-kHz, which is considered to be an indicator of distress as it is induced by stressors such as maternal separation or hypothermia (Allin & Banks, 1972; Blumberg & Alberts, 1990; Hofer et al., 2001; Weber et al., 2000). To our knowledge, the effect of NMS on the early development pattern of this USV response has not been studied yet.

Neuromotor milestones and behavioral responses are good markers of connectivity maturation and thus can be used to study the nervous system ontogeny and maturation in a

noninvasive manner (Stelzner, 1971). To assess the neurodevelopmental processes, several classic protocols have been developed in rodents, mainly using a measure of sensorimotor reflexes, based on body balance and proprioception, and demonstrate not only cerebellum and vestibular nuclei connectivity, but also maturation of brainstem and sensorispinal transmission.

In addition, recent research on ELS, neurodevelopment or ultrasonic vocalization has shown differences among outbred strains. Studies by Schwarting and collaborators showed that Wistar pups emit more USVs than Sprague Dawley and Long Evans rats in a pup isolation test (Schwarting, 2018; Schwarting & Wohr, 2018). Rat strains have also been shown to differ in terms of anatomy, physiology and behaviors, such as social interaction, anxiety or spatial learning (Faraday, 2002; Faraday et al., 2005; Manduca et al., 2014; Rex et al., 2004; Swerdlow et al., 2005). As these behaviors are also the ones affected by NMS, it is then interesting to determine whether the effects of NMS differ depending on the rat strain studied.

In this study, we sought to evaluate the early (i.e. before weaning) consequences of NMS on isolation USVs emission on the emergence of sensorimotor functions and on nociceptive responses in two different rat strains, Wistar and Sprague Dawley (SD).

We hypothesized that an ELS such as NMS could result in developmental delays in the emergence of sensorimotor functions, as well as precocious alterations in pain sensation, possibly related to abnormal neurodevelopment and myelination.

## **Materials & Methods**

### **Animals**

Experiments were performed in the Chronobiotron UMS 3415 animal facility, registered under the agreement E6721838. Adult female Wistar rats were mated with males for one week for breeding at the Chronobiotron facility (Strasbourg, France) or purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain Nuelles, France). Pregnant dams were then transferred to the animal facility during the last week of gestation and carefully monitored for delivery. Pregnant Sprague-Dawley dams were also purchased from Charles River

Laboratories. Mothers, arrived at E14, were carefully monitored for delivery. The day of birth was referred to as postnatal day 0 (P0). Mother and pups were housed in a temperature (22°C) and humidity (50 ± 20%) controlled room, under a 12h light-dark cycle (lights on at 7:00 am), with *ad libitum* access to food and tap water. All procedures were conducted in accordance with EU regulations and approved by the regional ethical committee regarding animal experimentation (APAFIS#28035-2020111810199988).

### **Neonatal maternal separation protocol**

Dams and their litters were randomly assigned to the control (CTRL) or NMS group at parturition. Litters from the NMS group were separated from their home cage, where the dam remained, for three hours per day from P2 to P12, and placed in a separate room under a heat lamp to maintain their temperature. Separation took place in the early afternoon, during the light phase of the 12:12h light/dark cycle. The control litters remained undisturbed during this time.

### **Evaluation of sensorimotor development**

Testing was performed at 11:00am, prior to separation. Three pups were removed from the mother at once to perform the tests for a maximum of 10 minutes in order to avoid prolonged separation from the dam. After the 10-minute session, the pups were returned to the home cage and a new group of three pups was removed following the same protocol.

Pups were weighted prior to testing. The order of testing was determined in order to alternate between highly demanding and easier exercises, and was adapted from previous studies (Busby & Sherwood, 2017; Feather-Schussler & Ferguson, 2016). The order was as follows: surface righting, orientation on an inclined plane, forelimb grip strength, cliff avoidance and tactile startle. The isolation-induced USV test was performed on a subset of animals prior to maternal separation.

Eye opening was scored as follows: 0 for fully closed, 2 for fully opened. Each eye was scored separately and the scores were added up, with a maximum score of 4 indicating that both eyes were fully open.

In the surface rightening test, pups were placed in a supine position with their limbs held loosely for a few seconds. On release, the time taken to complete a 180° turnover was measured. Pups were considered to have returned to a prone position when all four paws were under the body. A maximum of 60 seconds was allowed for the test, and the reflex was considered acquired if the pups turned over in less than one second. The test was repeated twice and the results averaged.

For the negative geotaxis, pups were placed face down on an inclined surface. The surface was at a 20° angle to the horizontal and covered with thin wire mesh. The latency for the pup to make a 180° turn to face upwards was recorded. The test is repeated twice, and the analysis is based on the best trial. If the animal falls, the trial is disregarded. The reflex is considered acquired when the animal turns around in less than 20 seconds. If the pup fell during both trials, no value was recorded and the trial was considered not acquired. As some studies used a 45° angle, we also performed the test with this angle in a subset group of pups.

We tested forelimb grip strength by placing the pups on a wire mesh that was held horizontally. The surface was then slowly rotated until it reached an angle of 180°. The angle at which the pup fell from the tilted wire mesh was recorded. The test was repeated twice and the results averaged.

In the cliff avoidance test, the pup was placed on the edge of an elevated surface (30 cm high) with nose and forepaws at the border of the edge. Latency for the pup to remove itself from the edge was measured. A maximum of 30 seconds was allowed for the test, and avoidance considered only when both front paws and head had been moved away from the edge. A score of 0 was assigned when the animal remained immobile, a score of 1 when it unsuccessfully attempted to move away from the edge or if the avoidance latency is greater than 10 s and a score of 2 when he managed to get away in less than 10 seconds. The test is repeated twice, and the analysis is based on the sum of the two tests scores (maximum possible: score of 4).

To assess tactile startle, a puff of air was applied to the face and hindquarters of the pups by squeezing a plastic transfer pipette. Startle was considered to be present if the pups showed a rapid movement in response to the puff of air. Scoring was as follows: 0 no response; 1 startle

after tactile stimulation on the face or hindquarters; 2 startles to both face and hindquarters stimuli (maximum score = 2).

### **USV recordings of the isolation test**

To elicit 40 kHz isolation-induced USV pups were individually removed from their home cage and mother and gently placed in a Plexiglas box (size) for USV recording in a sound-attenuated room. Recordings were performed for three minutes using Pettersson M500-384 USB ultrasonic microphone and a computer running Ultravox XT (3.0.80) software (Noldus Information Technology, Netherlands), which can record the spectrum of ultrasonic sounds up to a maximum frequency of 160 kHz. Specific research criteria were applied to the spectrogram to identify the calls to be analysed: frequency range 30-50 kHz, minimum amplitude of 70, minimum call duration of 50 ms, time interval of 10 ms. 7 pups per group were tested, one at a time to avoid maternal arousal. After the first isolation test, the pups were identified with a surgical marker. The room temperature ( $22 \pm 2$  °C) was kept constant throughout the experiment and between sessions. To avoid an additive effect of the procedures, USV recordings were performed in litters different from those used for sensorimotor development.

### **Pain sensitivity**

Pain sensitivity was assessed in the early afternoon, after the sensorimotor test but before maternal separation. Pups used for USV recording were also tested for pain sensitivity testing.

Hot thermal nociceptive thresholds were measured at P9 and P16 using the tail immersion test. Animals were loosely restrained in a towel, and the third distal of the tail was immersed in a water bath set at 42°C, temperatures being adapted from a recent study by Ford (Ford et al., 2019). The latency to withdraw was recorded, and the cut-off was set at 30 seconds to avoid any tissue damage. The test was performed twice, and the values were then averaged.

Mechanical nociceptive thresholds were assessed from at P17 and P25 using calibrated forceps (Bioseb, France), as previously validated in our laboratory (Luis-Delgado et al., 2006). Briefly, animals were loosely restrained with a towel covering the eyes, and increasing force was applied to a hind paw with the tips of the forceps. Measurements were performed three time

for each hind paw and the values of the pressure that elicited withdrawal of the paw were recorded and averaged.

## **Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 software (LaJolla, USA). The normal distribution of the values was verified using a Shapiro-Wilk or Kolmogorov-Smirnov test. A p value below 0.05 was considered statistically significant. To investigate the effect of the following factors, time, strain and neonatal treatment, and their interactions we used a three-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) to analyze the results or a three way mixed effect ANOVA when some time points were missing, followed by a Tukey's multiple comparisons *post hoc* test.

## **Results**

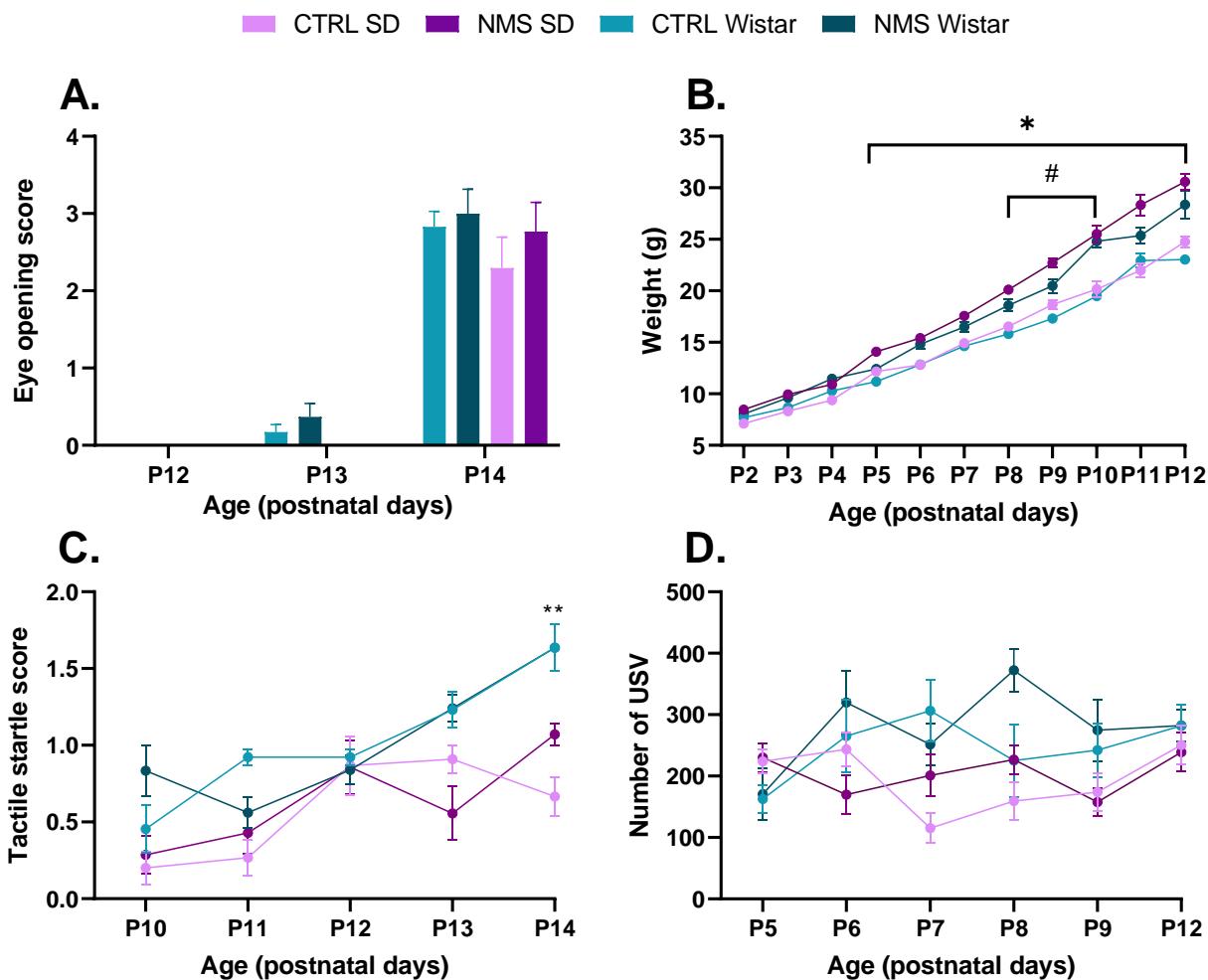
We used eye opening as a marker of physical maturation (Figure 1.A). Pups from all the groups had opened both of their eyes at P15. Statistical analysis showed an effect of time, a closed to significant effect of strain with Wistar pups showing precocious eye opening scores compared to SD and no effect of NMS (Three way ANOVA matched by time  $p<0.0001$  for time,  $p=0.06$  for strain and  $p=0.23$  for neonatal treatment).

The weight of all groups increased continuously throughout the test period (Figure 1.B). The statistical analysis showed an effect of time, strain and of neonatal treatment (Three-way mixed effect ANOVA matched by time,  $p<0.0001$  for time and for neonatal treatment,  $p=0.0096$  for strain). SD pups showed larger weight than Wistar. NMS influenced this evolution of the weight, as from P5 to P12, NMS SD pups have a significantly higher weight than their CTRL group and the same is observed for Wistar pups from P8 to P10.

Tactile startle (Figure 1.C) was elicited after face or hindquarter stimuli in most CTRL and NMS animals starting from P10, as their scores at this time are inferior to 1. Statistical analysis showed an effect of time and strain but no effect of NMS (Three-way mixed effect ANOVA matched by time,  $p<0.0001$  for time and strain and  $p=0.6842$  for neonatal treatment). With time, scores increased in all groups. There was a significant difference in the appearance of the

tactile startle reflex between CTRL Wistar and CTRL SD at P14, with Wistar pups scoring higher than SD ( $1,6 \pm 0,50$  for Wistar and  $0,6 \pm 0,48$  for SD).

A few pups were measured for USV emission in response to isolation (Figure 1.D). Statistical analysis revealed an effect of time and strain, but no effect of NMS as the number of calls increased with time and Wistar pups vocalized more than SD (Three-way ANOVA matched by time  $p=0.048$ ,  $p=0.0014$  and  $p=0.28$  for the cited factors respectively).



**Figure 1: Characterization of physical development, tactile startle and ultrasonic vocalizations in SD and Wistar pups of CTRL and NMS groups.** (A) Eye opening score (CTRL Wistar n=35, NMS Wistar n=19, CTRL SD n= 17, NMS SD n=17) and (B) Weight measures (CTRL Wistar n=14-26, NMS Wistar n=17-31, CTRL SD n= 14-23, NMS SD n=13-22). (C) Tactile startle (CTRL Wistar n=11-26, NMS Wistar n=6-25, CTRL SD n=11-15, NMS SD n=9-14), (D) Ultrasonic vocalizations (CTRL and NMS Wistar n=8; CTRL and NMS SD n= 14). Statistical test: three way ANOVA and mixed effect ANOVA, time x strain x neonatal treatment, (\*) p<0.05 for NMS SD versus CTRL SD comparison and (#) p<0.05 for NMS Wistar versus CTRL Wistar, (\*\*) p<0.01 for CTRL Wistar versus CTRL SD using Tukey's multiple comparison *post hoc* test.

We then defined the time course of the appearance of several sensorimotor reflexes in both rat strains, using an adaptation of neonatal tests usually performed in mice (Figure 2).

In the surface righting test (Figure 2.A), the latency to complete a 180° turn decreased significantly over time in both strains and the statistical analysis revealed an effect of the factor time, strain and neonatal treatment (Three way mixed effect ANOVA matched by time,  $p<0.0001$  for time, strain, neonatal treatment, time x strain, strain x neonatal treatment and time x strain x neonatal treatment,  $p =0.0002$  for time x neonatal treatment). Surface righting reflex was considered acquired when full turnover was performed in 1 second or less. For CTRL Wistar pups, the latency to turnover was  $\leq 1$  s from P5 onwards, and the surface righting reflex was therefore considered to be acquired at this age. In CTRL SD, the latency to turn is around 1 s only at P11. Wistar strain acquired the reflex earlier than SD. In Wistar rats, NMS pups show a slightly delayed acquisition of the reflex with 30,43 % and 47,83 % of pups successfully performing the test at P3 and P4, respectively, compared to 55,56 % and 66,67 % of CTRL at the same postnatal ages. However, in SD pups, NMS induced on the contrary a precocious acquisition of the reflex. At P5, the latency of NMS SD pups to perform a turn was of  $3,78 \text{ s} \pm 0,66 \text{ s}$  and was lower than that of CTRLs, which was of  $8,04 \text{ s} \pm 1,85 \text{ s}$ . The reflex was considered acquired at P9 for NMS SD pups and P11 for CTRL SD.

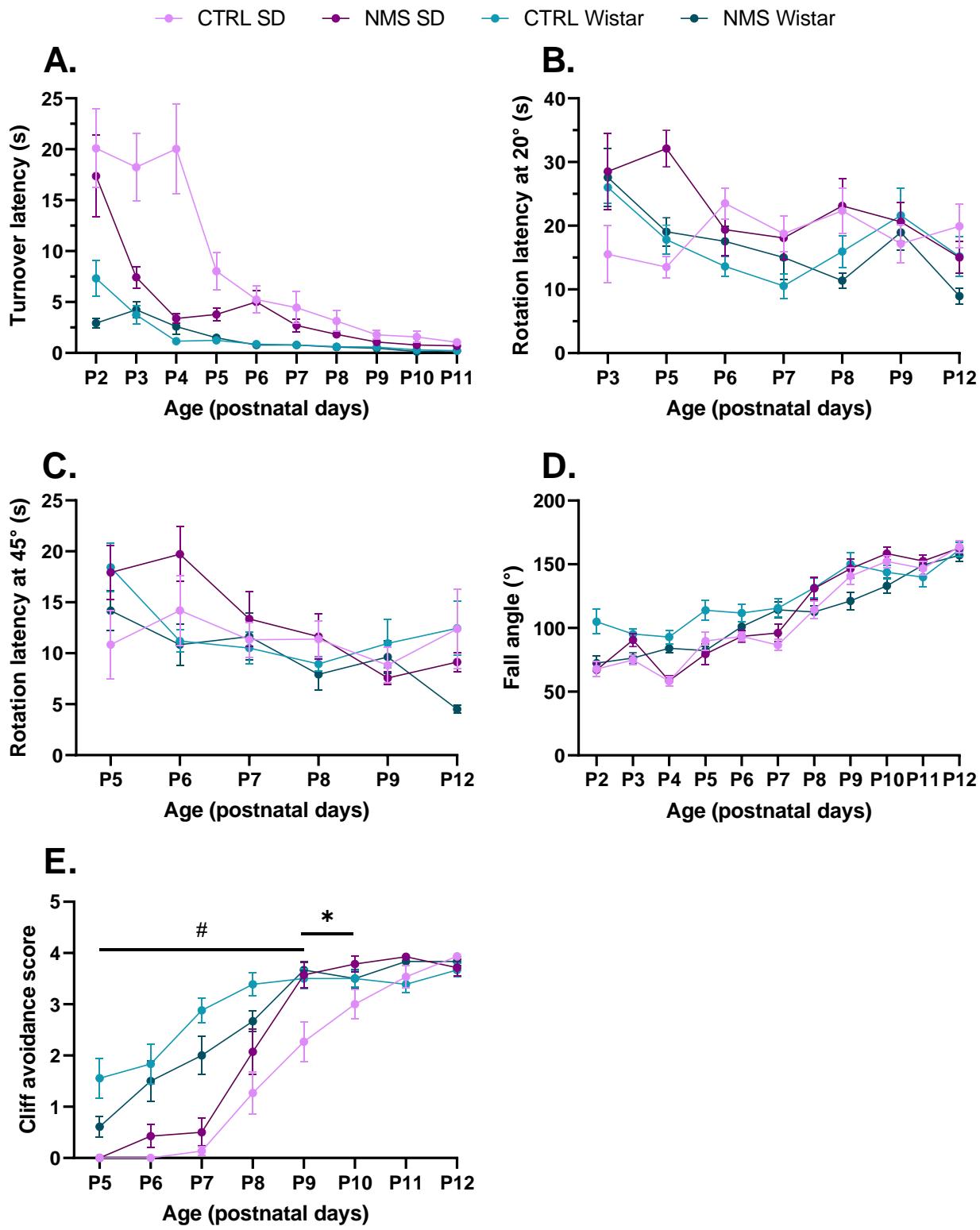
When placed face down on a 20° inclined plane to assess negative geotaxis (Figure 2.B), almost all pups fell off at P2 and P3. The task was considered successful if the pups were able to turn within 20 seconds. At P5, almost all pups were able to perform the test and a latency could be measured. The three way ANOVA could then only be performed from P3 onwards due to too much missing data at P2. It showed a significant effect of time and strain ( $p=0.0089$  and  $0.0053$ , respectively) as latencies to rotate of all pups decreased with time and SD pups were slower than Wistar.

As some studies use a 45° angle for this test, this was also tested in a small number of animals (Figure 2.C). The three way ANOVA revealed a significant effect of time ( $p=0.0014$ ) and an interaction between strain and neonatal treatment ( $p=0.03$ ), meaning that the latency of all

pups decreased with time and that neonatal treatment only impacted SD strain, as NMS SD pups were slower than CTRL SD at the first time points.

For the forelimb grip strength (Figure 2.D), the angle of fall increased over time for all groups. The statistical analysis revealed a significant effect of time but no effect of the strain or the neonatal treatment (Three way mixed effect ANOVA matched by time,  $p<0.0001$  for time).

In the cliff avoidance test (Figure 2.E), scores increased over time and statistical analysis was started at P5 as most pups demonstrated an incapacity to perform the test at an early age. Analysis (Three way mixed effect ANOVA matched by time) revealed a significant effect of time and strain ( $p<0.0001$  for both factors), and of the interaction of time x neonatal treatment and strain x neonatal treatment ( $p=0.005$  and  $p=0.004$  respectively). CTRL Wistar pups had significantly higher scores from P5 to P9 compared to CTRL SD pups, thus the reflex was considered to be acquired at P9 for Wistar pups whereas it was acquired at P11 in SD pups. NMS had opposite effects on the two strains. It caused a tendency to a delay in the acquisition of the reflex in Wistars pups whereas it significantly advanced it in SD pups. In fact, the scores of NMS SD pups exceeded 3.5 at P9, two days earlier than CTRL SD pups.

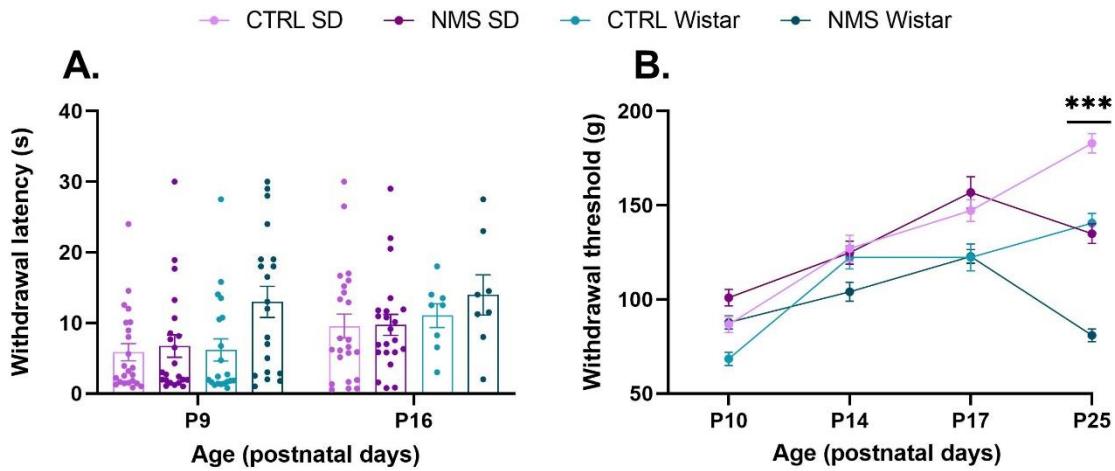


**Figure 2: Assessment of developmental milestones in SD and Wistar pups of CTRL and NMS groups.** (A) Surface rightening (CTRL Wistar n=13-21, NMS Wistar n=20-28, CTRL SD n= 15-23, NMS SD n=14-22). (B) Negative geotaxis at a 20°angle angle (CTRL Wistar n=8, NMS Wistar n=8, CTRL SD n= 6, NMS SD n=8) and (C) at a 45° angle (CTRL Wistar n=7-8, NMS Wistar n=6-8, CTRL SD n=3-8, NMS SD n=6-8). (D) Forelimb grip strength (CTRL Wistar n=12-18, NMS Wistar n=17-23, CTRL SD n= 6-15, NMS SD n=5-14) and (E) Cliff avoidance (CTRL Wistar n=12-18, NMS Wistar n=18, CTRL SD n= 15, NMS SD n=14). Statistical test: three-way mixed effect ANOVA, matched by time, time x strain x neonatal treatment, (\*) p<0.05 for comparison between CTRL and NMS SD pups and (#) p<0.05 for comparison between CTRL Wistar and SD pups using Tukey's multiple comparison *post hoc* test. All values are mean  $\pm$  SEM. CTRL: control. SD: Sprague Dawley.

Given our previous studies demonstrating an altered pain phenotype in adult rats that had been exposed to NMS (Juif et al., 2016; Melchior et al., 2018), we next assessed pain sensitivity to thermal hot and mechanical stimuli in pups (Figure 3).

Thermal hot nociception was tested at P9 and P16 (Figure 3.A). Statistical analysis revealed an effect of time and strain and a close to significant effect of neonatal treatment (Three way mixed effect ANOVA matched by time,  $p=0,02$  for time,  $p=0,04$  for strain and  $p=0,052$  for neonatal treatment). The withdrawal latency from water at  $42^{\circ}\text{C}$  at P9 was  $6,18 \text{ s} \pm 1,58 \text{ s}$  for CTRL Wistar pups and  $5,87 \text{ s} \pm 1,22 \text{ s}$  for CTRL SD pups. Also, at P9, even though NMS Wistar pups had the higher withdrawal latency, it was not significantly different compared to CTRL animals (*post hoc* Tukey's test) (CTRL  $6,18 \text{ s} \pm 1,58 \text{ s}$  vs NMS  $12,98 \text{ s} \pm 2,21 \text{ s}$  in Wistar and CTRL  $5,87 \text{ s} \pm 1,22 \text{ s}$  vs NMS  $6,73 \text{ s} \pm 1,59 \text{ s}$  in SD pups). At P16, all groups and conditions of animals showed similar withdrawal latencies.

For mechanical nociception (Figure 3.B), statistical analysis revealed an effect of time, strain and neonatal treatment (Three way ANOVA matched by time,  $p<0,0001$  for all factors). Until P17, CTRL and NMS animals from both strains displayed similar PWT when tested with calibrated forceps. When comparing strains at P25, CTRL SD rats have significantly higher thresholds than CTRL Wistar ( $182,9 \text{ g} \pm 5,2 \text{ g}$  in SD vs  $140,6 \text{ g} \pm 5,2 \text{ g}$  in Wistar), suggesting a phenotypic difference after weaning. Regarding the effect of NMS, mechanical nociceptive thresholds in NMS SD pups are significantly lower than CTRL SD pups ( $134,9 \text{ g} \pm 5,27 \text{ g}$  in NMS vs  $182,9 \text{ g} \pm 5,2 \text{ g}$  in CTRL). Similarly, for Wistar rats, NMS pups showed a significantly lower threshold than CTRL pups ( $80,9 \text{ g} \pm 3,47 \text{ g}$  in NMS vs  $140,6 \text{ g} \pm 5,2 \text{ g}$  in CTRL). This suggests the emergence of a durable hypersensitivity to mechanical stimuli around the third postnatal week of life.



**Figure 3: Pain sensitivity milestones in SD and Wistar pups of CTRL and NMS groups.** (A) Thermal nociception assessed with the tail immersion test (CTRL Wistar n=8-20, NMS Wistar n=8-20, CTRL SD n=23, NMS SD n=22), statistical test: three-way mixed effect ANOVA, matched by time, time x strain x neonatal treatment. (B) Mechanical nociception tested using calibrated forceps (n=8 per group), statistical test: three-way ANOVA, matched by time, time x strain x neonatal treatment, (\*\*\*) $p<0.01$  for intragroup and intergroup comparison using Tukey's multiple comparison *post hoc* test. All values are mean  $\pm$  SEM. CTRL: control. SD: Sprague Dawley. NMS: neonatal maternal separation. ANOVA: analysis of variance. SEM: standard error of the mean. All values are mean  $\pm$  SEM. CTRL: control. SD: Sprague Dawley. NMS: neonatal

## Discussion

In this study, regarding the strain comparison, we have shown that under our conditions, Wistar pups had a lower weight gain compared to SD pups, vocalized more than them in the isolation induced USVs test and were more sensitive when tested for mechanical nociception at P25. Regarding the neurodevelopment, the results of the two strains differed except for the forelimb grip strength test. Wistar pups were faster than SD pups in the surface righting and negative geotaxis tests and had better scores in the tactile startle and cliff avoidance tests, demonstrating that genetic differences can be observed in the phenotype of the animal, as early as two days after birth. As for the impact of NMS, it induced a higher weight gain in both strains and leaded to a tendency for early acquisition of the sensorimotor reflexes in SD rats, with respect to surface righting and cliff avoidance tests, whereas no effect or a tendency for delay is observed in Wistar rats. However, no differences were observed in tests assessing

negative geotaxis and forelimb grip strength, suggesting that separation stress, even if it moderately changes the appearance of certain physical characteristics or reflexes, does not alter the development of gross motor functions in the short or long term. NMS also induced a time- and modality-dependent alteration in nociceptive thresholds, characterized by a mechanical hypersensitivity at P25 in both strains, as for thermal hot nociception, only a tendency for hyposensitivity at P9 was observed in Wistar pups.

Most of the studies evaluating the occurrence of sensorimotor reflexes in rodents have been carried out in mouse models and only limited data are available for the Wistar and SD rat. However, the developmental milestones assessed here are consistent with those found in the few studies conducted in rats models (Nguyen et al., 2017; Schroeder et al., 1995). Studies on USVs in pups have demonstrated the same difference as in here with Wistar rats gaining weight more slowly than SD but also vocalizing more than them when tested at P11 (Schwarting & Wohr, 2018). This developmental difference regarding the production of USV can also be tied to the weight difference, as higher body weights were associated with lower frequencies in calls, however not in the quantity (Blumberg et al., 2000).

During the neonatal period and until weaning, NMS pups had a significantly higher weight gain than the CTRL groups. In general, these differences in body weight appear to be transient: under our conditions and in other studies, they disappear by adulthood (Farkas et al., 2009; Kalinichev et al., 2002). In the literature, weight gain seems to vary according to the neonatal stress model and the species studied. Some studies describe a decrease in weight during the neonatal period (McIntosh et al., 1999) while others show an increase only in females (Kalinichev et al., 2002) or a trend in males (Farkas et al., 2009). A hormonal imbalance affecting leptin, ghrelin or growth hormones could explain these temporary differences. Another hypothesis lies in the availability and quality of breast milk, which could be altered by the separation stress (Vallee et al., 1996). Studies have examined changes in the behavior of mothers submitted to this type of stress model and shown that they developed anxiety and that their caregiving was affected differently depending on the protocol of separation (Alves et al., 2020; Orso et al., 2019). Meta-analysis showed that a majority of studies report an increase in maternal behaviour in rats, such as licking, time spent in the nest

and nursing after reunion with the pups, and a minority a decrease or no changes, however, comparisons were limited because of the unique characteristics of each protocol (Alves et al., 2020; Orso et al., 2019).

No significant differences were observed regarding eye opening, except for a tendency towards early opening in SD rats, which could be due to high levels of glucocorticoids in the separated animals, known to accelerate sensory and physical development, indeed, glucocorticoids are given to pregnant women at risk of preterm birth to facilitate fetal lung maturation (Crane et al., 2003). A study of Mesquita and collaborators on NMS impact in the neonatal period reported a higher basal plasma level of glucocorticoids in the separated animals at P21 (Mesquita et al., 2007). Other studies report that adult rats submitted to similar NMS present an increased expression of hypothalamic corticotropin releasing factor mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus and that in response to acute restrain stress their plasma level of adrenocorticotropic are higher than CTRL groups (R. Huot, 2004; Liu et al., 2000).

Regarding the effect of NMS on Wistar rats, sensorimotor developmental delay has been demonstrated in other models of ELS, including after a single 24 h maternal deprivation at P9 for negative geotaxis, eye opening and emergence of walking and rearing (Ellenbroek et al., 2009). In another model, after repeated NMS for 6 h per day from P2 to P15 delays were observed for air righting, surface righting and negative geotaxis, acquisition of postural reflex and in the wire suspension test (Mesquita et al., 2007). In a similar model of NMS from P2 to P15, a delay in neurobehavioral development was also observed in Wistar pups following NMS with significant differences between CTRL and NMS pups in grasping reflex, auditory startle and hot-plate test (hypersensitivity in NMS pups) (Qin et al., 2011). These changes were also associated with a down-regulation of reelin, a protein involved in neuronal migration during embryonic development, which was further regulated by DNA methylation in the hippocampus of NMS pups (Qin et al., 2011). Finally, a study by Farkas and co-workers evaluating neonatal reflexes in an NMS model similar to the one used here reported no drastic alteration of developmental milestones between CTRL and NMS Wistar rats when testing

hindlimb grasp and gait reflexes, foot fault, forelimb grasp, air righting reflex appearance, and surface righting performance (Farkas et al., 2009).

Given the strong involvement of brainstem and spinal cord functions in the establishment of sensorimotor reflexes (Altman & Sudarshan, 1975), further studies should be undertaken to identify the molecular mechanisms underlying this moderate developmental delay or advance, focusing on these regions. In particular, myelination processes should be assessed, especially in light of evidence suggesting hypomyelination in other brain regions following NMS (Teissier et al., 2020). The different conclusions of these studies (hypo- or hypermyelination) could be due to the different time point of analysis (P15 in mice vs. P21 in rats), to the different proliferation markers used, but also to the different separation protocols. Another hypothesis would be that the differences in myelination are region dependent.

The tail immersion test used in this study is considered to elicit a purely spinal reflex response but the high variability of the data makes it difficult to detect a strong effect of strain. About mechanical nociception, the phenotype of the two strains differs in terms of nociceptive sensitivity, as Wistar rats were more sensitive than SD at P25. This type of differences has already been studied in the literature on how genetic or sex modulate pain sensation (Vendruscolo et al., 2004). Other studies, mostly on neuropathic pain, also described differences due to strain on pain sensitivity, drug treatments or stress induced analgesia (Hestehave et al., 2019a, 2019b, 2020; Lariviere & Mogil, 2010; Yoon et al., 1999).

NMS induced a time-dependent change in nociceptive thresholds, characterized by a mechanical hypersensitivity, but not thermal, that appeared at P25 in both strains, as previously reported by our team in adult rats (Juif et al., 2016; Melchior et al., 2018). It must be borne in mind that the tail immersion test was not designed to be used in neonates and that it is a measure of immature function at this age, with changes still occurring in the functional establishment of spinal processing. Indeed, C-type fibers are still maturing to finally be functional at P10 (Fitzgerald, 1988; Jennings & Fitzgerald, 1998) and A-fibers innervation relocate from superficial layers I and II to the deeper layers of the dorsal horn (Beggs et al., 2002). And so, the tendency of thermal hot hyposensitivity observed in Wistar could be due

to the hypoexcitability of C-type dorsal root ganglia neurons in NMS animals which persists until P14 (Juif et al., 2016). During this same period, in addition to the ongoing maturation of the C-fibers, significant changes also occurs regarding inhibitory processing controlled by GABA-A and glycine receptors affecting synapse selectivity and chloride homeostasis (Baccei & Fitzgerald, 2004; Keller et al., 2001; Li et al., 2002; Rivera et al., 1999; Stil et al., 2009). Our previous study showed in NMS rats a sustained increase in the expression of Nav1.8, a voltage-gated channel specific to C-type fibers, which could be involved in this mechanical hypersensitivity present as early as P25. In line with this, changes in the expression of growth factors (NGF and GDNF) involved in C-type maturation as well as early changes in the expression of channels that sets the excitability of sensory neuron, have been reported in the spinal cord and dorsal root ganglia respectively following NMS (Juif et al., 2016). We also reported a long-lasting upregulation of chloride importer Na-K-Cl cotransporter type 1 resulting in a change of the GABAergic inhibition in the spinal cord that contributed to the hypersensitive phenotype of NMS animals (Gazzo et al., 2021). Finally, on the subject of descending control of pain, we also observed at adulthood a deficit in the oxytocinergic stress induced analgesia (Melchior et al., 2018).

Further analysis of the expression of markers involved in the maturation of the nociceptive system could provide useful information on the mechanisms underlying the reactivity of the spinal cord to nociceptive stimuli.

This study allowed a comparison for the neurodevelopment of Wistar and SD rats highlighting some differences in the acquisition of milestones that are important to consider in behavioral studies. It also demonstrates the innate aspect of resistance to certain types of stress, as shown by the opposite effect of NMS on the two strains: accelerating or delaying the acquisition of reflexes, revealing the importance of genetic background and predisposition. Differences on sensitivity and response to stress between various inbred and outbred rat strains were highlighted in multiple studies (Dhabhar et al., 2008; Faraday, 2002; Faraday et al., 2005; Gómez et al., 2008; Sarrieau et al., 1998). For a behavioral example, direct comparison of coping behaviours toward a social stressor demonstrated that Wistar rats engaged much more frequently in active coping behaviours than SD rats (i.e. initiations of

fights and upright defence posture) (Walker et al., 2009). Regarding examples of biochemical responses to stress at adulthood, SD rats did not present an increase in corticosterone secretion while an increase in Wistar rats was reported after three weeks of chronic mild stress (Harris et al., 1997).

Overall, we report no strong modification due to NMS as all pups acquired the reflexes in the same short period. If gross sensorimotor functions were spared, this slight discrepancy in acquisition dates and the hypersensitivity to nociceptive stimuli suggests a persistent disruption of more complex or subtle functions in adulthood.

**Acknowledgments:** This work was funded by Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg. This work of the Interdisciplinary Thematic Institute NeuroStra, as part of the ITI 2021-2028 program of the University of Strasbourg, CNRS and Inserm, was supported by IdEx Unistra (ANR-10-IDEX-0002) under the framework of the French Program *Investments for the Future*. We thank the following research programs of excellence for their support: Fondation Université de Strasbourg through the Strasbourg Pain Initiative, French National Research Agency (ANR) through the Programme d'Investissement d'Avenir (contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL Graduate school of pain) and Institut Thématisque Interdisciplinaire NeuroStra. PP is a senior fellow of the Institut Universitaire de France.

## **References:**

- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., & Ramirez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256-266. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.12.013>
- Allin, J. T., & Banks, E. M. (1972). Functional aspects of ultrasound production by infant albino rats (*Rattus norvegicus*). *Animal Behaviour*, 20(1), 175-185. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(72\)80189-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(72)80189-1)
- Altman, J., & Sudarshan, K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*, 23, 896-920. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(75\)90114-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(75)90114-1)
- Alves, R. L., Portugal, C. C., Summaville, T., Barbosa, F., & Magalhães, A. (2020). Maternal separation effects on mother rodents' behaviour : A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 117, 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.008>
- Baccei, M. L., & Fitzgerald, M. (2004). Development of GABAergic and Glycinergic Transmission in the Neonatal Rat Dorsal Horn. *The Journal of Neuroscience*, 24(20), 4749-4757. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5211-03.2004>
- Beggs, S., Torsney, C., Drew, L. J., & Fitzgerald, M. (2002). The postnatal reorganization of primary afferent input and dorsal horn cell receptive fields in the rat spinal cord is an activity-

- dependent process. *European Journal of Neuroscience*, 16(7), 1249-1258.  
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02185.x>
- Beland, B., & Fitzgerald, M. (2001). Mu- and delta-opioid receptors are downregulated in the largest diameter primary sensory neurons during postnatal development in rats. *Pain*, 90(1), 143-150. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00397-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00397-3)
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Rodgers, J., & Weiss, S. M. (1990). The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14(4), 463-472. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80069-7](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80069-7)
- Blumberg, M. S., & Alberts, J. R. (1990). Ultrasonic vocalizations by rat pups in the cold : An acoustic by-product of laryngeal braking? *Behavioral Neuroscience*, 104(5), 808-817.  
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.104.5.808>
- Blumberg, M. S., Sokoloff, G., & Kent, K. J. (2000). A developmental analysis of clonidine's effects on cardiac rate and ultrasound production in infant rats. *Developmental Psychobiology*, 36(3), 186-193. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(200004\)36:3<186::AID-DEV2>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(200004)36:3<186::AID-DEV2>3.0.CO;2-V)
- Bockhorst, K. h., Narayana, P. a., Liu, R., Ahobila-Vijjula, P., Ramu, J., Kamel, M., Wosik, J., Bockhorst, T., Hahn, K., Hasan, K. m., & Perez-Polo, J. r. (2008). Early postnatal development of rat brain : In vivo diffusion tensor imaging. *Journal of Neuroscience Research*, 86(7), 1520-1528.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.21607>
- Borta, A., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research*, 166(2), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.08.009>
- Brudzynski, S. M. (2021). Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. *Brain Sciences*, 11(5), 605. <https://doi.org/10.3390/brainsci11050605>
- Busby, E. R., & Sherwood, N. M. (2017). Gonadotropin-releasing hormone receptor (Gnrhr) gene knock out : Normal growth and development of sensory, motor and spatial orientation behavior but altered metabolism in neonatal and prepubertal mice. *PLoS ONE*, 12(3), e0174452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174452>
- Choy, V. J., & Watkins, W. B. (1979). Maturation of the hypothalamo-neurohypophyseal system : I. localization of norephelin, oxytocin and vasopressin in the hypothalamus and neural lobe of the developing rat brain. *Cell and Tissue Research*, 197(2).  
<https://doi.org/10.1007/BF00233923>
- Coutinho, S. V., Plotsky, P. M., Sablad, M., Miller, J. C., Zhou, H., Bayati, A. I., McRoberts, J. A., & Mayer, E. A. (2002). Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282(2), G307-16.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00240.2001>
- Crane, J., Armon, A., Brunner, M., De La Ronde, S., Farine, D., Keenan-Lindsay, L., Leduc, L., Schneider, C., Van Aerde, J., & Executive Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. (2003). RETIRED : Antenatal corticosteroid therapy for fetal maturation. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et Gynecologie Du Canada: JOGC*, 25(1), 45-52. [https://doi.org/10.1016/s1701-2163\(16\)31081-7](https://doi.org/10.1016/s1701-2163(16)31081-7)

- Dhabhar, F. S., McEwen, B. S., & Spencer, R. L. (2008). Adaptation to Prolonged or Repeated Stress – Comparison between Rat Strains Showing Intrinsic Differences in Reactivity to Acute Stress. *Neuroendocrinology*, 65(5), 360-368. <https://doi.org/10.1159/000127196>
- Downes, N., & Mullins, P. (2014). The Development of Myelin in the Brain of the Juvenile Rat. *Toxicologic Pathology*, 42(5), 913-922. <https://doi.org/10.1177/0192623313503518>
- Ellenbroek, B. A., Derkx, N., & Park, H.-J. (2009). Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress*, 8(4), 247-257. <https://doi.org/10.1080/10253890500404634>
- Faraday, M. M. (2002). Rat sex and strain differences in responses to stress. *Physiol Behav*, 75(4), 507-522. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00645-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00645-5)
- Faraday, M. M., Blakeman, K. H., & Grunberg, N. E. (2005). Strain and sex alter effects of stress and nicotine on feeding, body weight, and HPA axis hormones. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 80(4), 577-589. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.01.015>
- Farkas, J., Reglodi, D., Gaszner, B., Szogyi, D., Horvath, G., Lubics, A., Tamas, A., Frank, F., Besirevic, D., & Kiss, P. (2009). Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull*, 79(3-4), 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.12.011>
- Feather-Schussler, D. N., & Ferguson, T. S. (2016). A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. *J Vis Exp*, 117. <https://doi.org/10.3791/53569>
- Fitzgerald, M. (1988). The development of activity evoked by fine diameter cutaneous fibres in the spinal cord of the newborn rat. *Neuroscience Letters*, 86(2), 161-166. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90564-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90564-2)
- Ford, Z. K., Dourson, A. J., Liu, X., Lu, P., Green, K. J., Hudgins, R. C., & Jankowski, M. P. (2019). Systemic growth hormone deficiency causes mechanical and thermal hypersensitivity during early postnatal development. *IBRO Reports*, 6, 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.02.001>
- Gazzo, G., Melchior, M., Caussaint, A., Gieré, C., Lelièvre, V., & Poisbeau, P. (2021). Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 92, 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.010>
- Gómez, F., Lahmame, A., de Kloet, R., & Armario, A. (2008). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Chronic Stress in Five Inbred Rat Strains : Differential Responses Are Mainly Located at the Adrenocortical Level. *Neuroendocrinology*, 63(4), 327-337. <https://doi.org/10.1159/000126973>
- Harris, R. B. S., Zhou, J., Youngblood, B. D., Smagin, G. N., & Ryan, D. H. (1997). Failure to Change Exploration or Saccharin Preference In Rats Exposed to Chronic Mild Stress. *Physiology & Behavior*, 63(1), 91-100. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00425-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00425-3)
- Hestehave, S., Abelson, K. S. P., Brønnum Pedersen, T., Finn, D. P., Andersson, D. R., & Munro, G. (2020). The influence of rat strain on the development of neuropathic pain and comorbid anxiety-depressive behaviour after nerve injury. *Scientific Reports*, 10(1), 20981. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77640-8>

- Hestehave, S., Abelson, K. S. P., Brønnum Pedersen, T., & Munro, G. (2019a). The analgesic efficacy of morphine varies with rat strain and experimental pain model : Implications for target validation efforts in pain drug discovery. *European Journal of Pain*, 23(3), 539-554. <https://doi.org/10.1002/ejp.1327>
- Hestehave, S., Abelson, K. SP., Brønnum Pedersen, T., & Munro, G. (2019b). Stress sensitivity and cutaneous sensory thresholds before and after neuropathic injury in various inbred and outbred rat strains. *Behavioural Brain Research*, 375, 112149. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112149>
- Hofer, M. A., Shair, H. N., & Brunelli, S. A. (2001). Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. *Current Protocols in Neuroscience*, 17(1), 8.14.1-8.14.16. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0814s17>
- Huot, R. (2004). Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology*, 29(2), 279-289. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00028-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00028-3)
- Huot, R. L., Plotsky, P. M., Lenox, R. H., & McNamara, R. K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research*, 950(1), 52-63. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02985-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02985-2)
- Jennings, E., & Fitzgerald, M. (1998). Postnatal changes in responses of rat dorsal horn cells to afferent stimulation : A fibre-induced sensitization. *The Journal of Physiology*, 509(3), 859-868. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.859bm.x>
- Juif, P. E., Salio, C., Zell, V., Melchior, M., Lacaud, A., Petit-Demouliere, N., Ferrini, F., Darbon, P., Hanesch, U., Anton, F., Merighi, A., Lelievre, V., & Poisbeau, P. (2016). Peripheral and central alterations affecting spinal nociceptive processing and pain at adulthood in rats exposed to neonatal maternal deprivation. *Eur J Neurosci*, 44(3), 1952-1962. <https://doi.org/10.1111/ejn.13294>
- Kalinichev, M., Easterling, K. W., Plotsky, P. M., & Holtzman, S. G. (2002). Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 73(1), 131-140. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(02\)00781-5](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00781-5)
- Keller, A. F., Coull, J. A. M., Chéry, N., Poisbeau, P., & De Koninck, Y. (2001). Region-Specific Developmental Specialization of GABA-Glycine Cosynapses in Laminas I-II of the Rat Spinal Dorsal Horn. *The Journal of Neuroscience*, 21(20), 7871-7880. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-07871.2001>
- Kikusui, T., & Mori, Y. (2009). Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(4), 427-431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01837.x>
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychological Bulletin*, 128(6), 961-977. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.128.6.961>
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thrivikraman, K. V., Nemerooff, C. B., & Plotsky, P. M. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biological Psychiatry*, 55(4), 367-375. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.007>

- Lariviere, W. R., & Mogil, J. S. (2010). The Genetics of Pain and Analgesia in Laboratory Animals. In A. Szallasi (Ed.), *Analgesia : Methods and Protocols* (p. 261-278). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-323-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-323-7_20)
- Li, H., Tornberg, J., Kaila, K., Airaksinen, M. S., & Rivera, C. (2002). Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *European Journal of Neuroscience*, 16(12), 2358-2370. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02419.x>
- Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (2000). Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(1), 5-12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00422.x>
- Luis-Delgado, O. E., Barrot, M., Rodeau, J. L., Schott, G., Benbouzid, M., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M. J., & Lasbennes, F. (2006). Calibrated forceps : A sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain*, 7(1), 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.07.011>
- Manduca, A., Campolongo, P., Palmery, M., Vanderschuren, L. J. M. J., Cuomo, V., & Trezza, V. (2014). Social play behavior, ultrasonic vocalizations and their modulation by morphine and amphetamine in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology*, 231(8), 1661-1673. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3337-9>
- McIntosh, J., Anisman, H., & Merali, Z. (1999). Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats : Gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res*, 113(1-2), 97-106. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(99\)00005-x](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(99)00005-x)
- Melchior, M., Juif, P. E., Gazzo, G., Petit-Demouliere, N., Chavant, V., Lacaud, A., Goumon, Y., Charlet, A., Lelievre, V., & Poisbeau, P. (2018). Pharmacological rescue of nociceptive hypersensitivity and oxytocin analgesia impairment in a rat model of neonatal maternal separation. *Pain*, 159(12), 2630-2640. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001375>
- Melchior, M., Kuhn, P., & Poisbeau, P. (2021). The burden of early life stress on the nociceptive system development and pain responses. *Eur J Neurosci*. <https://doi.org/10.1111/ejn.15153>
- Mesquita, A. R., Pego, J. M., Summavieille, T., Maciel, P., Almeida, O. F., & Sousa, N. (2007). Neurodevelopment milestone abnormalities in rats exposed to stress in early life. *Neuroscience*, 147(4), 1022-1033. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.007>
- Nguyen, A. T., Armstrong, E. A., & Yager, J. Y. (2017). Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 122, 55261. <https://doi.org/10.3791/55261>
- Noirot, E. (1968). Ultrasounds in young rodents. II. Changes with age in albino rats. *Animal Behaviour*, 16(1), 129-134. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(68\)90123-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(68)90123-1)
- Orso, R., Creutzberg, K. C., Wearick-Silva, L. E., Wendt Viola, T., Trachtenberg, S. G., Benetti, F., & Grassi-Oliveira, R. (2019). How Early Life Stress Impact Maternal Care : A Systematic Review of Rodent Studies. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2019.00197>
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 18(3), 195-200. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(93\)90189-v](https://doi.org/10.1016/0169-328x(93)90189-v)

- Qin, L., Tu, W., Sun, X., Zhang, J., Chen, Y., & Zhao, H. (2011). Retardation of neurobehavioral development and reelin down-regulation regulated by further DNA methylation in the hippocampus of the rat pups are associated with maternal deprivation. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.018>
- Rex, A., Voigt, J.-P., Gustedt, C., Beckett, S., & Fink, H. (2004). Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology*, 177(1-2), 23-34. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1914-7>
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., & Kaila, K. (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397(6716), 251-255. <https://doi.org/10.1038/16697>
- Romijn, H. J., Hofman, M. A., & Gramsbergen, A. (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Human Development*, 26(1), 61-67. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(91\)90044-4](https://doi.org/10.1016/0378-3782(91)90044-4)
- Sarrieau, A., Chaouloff, F., Lemaire, V., & Mormède, P. (1998). Comparison of the neuroendocrine responses to stress in outbred, inbred and F1 hybrid rats. *Life Sciences*, 63(2), 87-96. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00243-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00243-4)
- Schroeder, H., Humbert, A. C., Koziel, V., Desor, D., & Nehlig, A. (1995). Behavioral and metabolic consequences of neonatal exposure to diazepam in rat pups. *Experimental Neurology*, 131(1), 53-63. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(95\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(95)90007-1)
- Schwaller, F., Kwok, C., & Fitzgerald, M. (2016). Postnatal maturation of the spinal-bulbo-spinal loop : Brainstem control of spinal nociception is independent of sensory input in neonatal rats. *Pain*, 157(3), 677-686. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000420>
- Schwarting, R. K. W. (2018). Ultrasonic vocalization in female rats : A comparison among three outbred stocks from pups to adults. *Physiol Behav*, 196, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.08.009>
- Schwarting, R. K. W., & Wohr, M. (2018). Isolation-induced ultrasonic vocalizations in pups : A comparison between Long-Evans, Sprague-Dawley, and Wistar rats. *Dev Psychobiol*, 60(5), 534-543. <https://doi.org/10.1002/dev.21738>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans : Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, 106-107, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- Stelzner, D. J. (1971). The normal postnatal development of synaptic end-feet in the lumbosacral spinal cord and of responses in the hind limbs of the albino rat. *Exp Neurol*, 31(3), 337-357. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(71\)90237-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(71)90237-8)
- Stil, A., Liabeuf, S., Jean-Xavier, C., Bocard, C., Viemari, J.-C., & Vinay, L. (2009). Developmental up-regulation of the potassium-chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience*, 164(2), 809-821. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.035>
- Swerdlow, N. R., Kuczenski, R., Goins, J. C., Crain, S. K., Ma, L. T., Bongiovanni, M. J., & Shoemaker, J. M. (2005). Neurochemical analysis of rat strain differences in the startle gating-disruptive effects of dopamine agonists. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 80(2), 203-211. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.11.002>

- Teissier, A., Le Magueresse, C., Olusakin, J., Andrade da Costa, B. L. S., De Stasi, A. M., Bacci, A., Imamura Kawasawa, Y., Vaidya, V. A., & Gaspar, P. (2020). Early-life stress impairs postnatal oligodendrogenesis and adult emotional behaviour through activity-dependent mechanisms. *Mol Psychiatry*, 25(6), 1159-1174. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0493-2>
- Vallee, M., Mayo, W., Maccari, S., Le Moal, M., & Simon, H. (1996). Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters : Relationship to corticosterone secretion response. *Brain Res*, 712(2), 287-292. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01459-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01459-4)
- Vendruscolo, L. F., Pamplona, F. A., & Takahashi, R. N. (2004). Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. *Brain Research*, 1030(2), 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.10.016>
- Walker, F. R., Naicker, S., Hinwood, M., Dunn, N., & Day, T. A. (2009). Strain differences in coping behaviour, novelty seeking behaviour, and susceptibility to socially conditioned fear : A comparison between Wistar and Sprague Dawley rats. *Stress*, 12(6), 507-516. <https://doi.org/10.3109/10253890802673134>
- Weber, M., Paxinos, G., & Richardson, R. (2000). Conditioned changes in ultrasonic vocalizations to an aversive olfactory stimulus are lateralized in 6-day-old rats. *Developmental Psychobiology*, 37(3), 121-128. [https://doi.org/10.1002/1098-2302\(200011\)37:3<121::aid-dev1>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1098-2302(200011)37:3<121::aid-dev1>3.0.co;2-f)
- White, N. R., Cagiano, R., Moises, A. U., & Barfield, R. J. (1990). Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 104(3), 255-262. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.104.3.255>
- Yoon, Y. W., Lee, D. H., Lee, B. H., Chung, K., & Chung, J. M. (1999). Different strains and substrains of rats show different levels of neuropathic pain behaviors. *Experimental Brain Research*, 129(2), 167-171. <https://doi.org/10.1007/s002210050886>

## Article 2 : Conséquences de la séparation maternelle néonatale sur la contagion de la douleur chez le rat Sprague Dawley

Notre équipe « Life Adversities and Pain » étant pluridisciplinaire et ayant une approche transversale dans les sujets de recherches abordés, ces travaux ont été effectués en parallèle de ceux entamés chez l'Homme afin d'amener de nouvelles propositions et explications à certaines conséquences de l'adversité précoce. En effet, la Dr Melchior Meggane étudie l'impact de la prématurité sur l'empathie à la douleur, nous avons donc voulu vérifier si dans notre modèle animal de SMN il existait des altérations de la fonction s'approchant le plus de l'empathie : la contagion émotionnelle.

Nous avons donc effectué un test de contagion de la douleur dans lequel un animal observateur (AO) est hébergé ou interagit pendant au moins 30min avec un animal démonstrateur (AD) familier auquel un stimulus nociceptif a été appliqué et qui présente donc des comportements de type douloureux. A la suite de l'interaction des deux animaux, les seuils nociceptifs de l'AO sont mesurés ainsi que le temps qu'il passe à avoir des comportements prosociaux dits de « réconforts » (allo-toilettages, allo-léchages, mouvement de tête rythmique vers la patte blessée...) envers l'AD. Deux types de stimuli ont été testés, une injection de formaline (douleur inflammatoire courte, de l'ordre de l'heure) et l'adjuvant complet de Freund (CFA) (douleur inflammatoire longue, environ deux semaines). Deux modalités nociceptives ont été évaluées : mécanique avec le test de la pince calibrée et thermique au chaud avec le test du Plantar. Dans les exemples de la littérature, à la suite de l'interaction, l'AO présente une hypersensibilité nociceptive et une augmentation des comportements de réconforts.

Dans nos conditions, cette hypersensibilité de l'AO n'a pas été retrouvée dans les deux groupes testés contrôle et SMN. Cependant, l'évaluation des comportements prosociaux montrent un déficit de ces derniers chez les animaux SMN car seuls les animaux du groupe contrôle ont présenté une augmentation de la durée de ces comportements.

Pour cette étude, j'ai effectué la totalité des tests de comportements et évaluation associées pour les deux modèles de douleur (CFA et formaline).

# The impact of neonatal maternal separation on contagion of pain in Sprague Dawley rat

Yasmine Brik<sup>1</sup>, Pierrick Poisbeau <sup>1\*</sup> and Meggane Melchior <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centre National de la recherche Scientifique et Université de Strasbourg, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (CNRS UMR 7364) – 12 rue Goethe, 67000, Strasbourg, France

*\*Corresponding author:*

Meggane Melchior, PhD, CNRS UMR 7364, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Research group “Life adversity and pain” – 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France. Email: [mmelchior@unistra.fr](mailto:mmelchior@unistra.fr)

Prof. Pierrick Poisbeau, CNRS UMR 7364, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Research group “Life adversity and pain” – 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France. Email: [poisbeau@inci-cnrs.unistra.fr](mailto:poisbeau@inci-cnrs.unistra.fr)

Acknowledgments: This work was funded by Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg and Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC 2019). We thank the following research programs of excellence for their support: Fondation Université de Strasbourg through the Strasbourg Pain Initiative, French National Research Agency (ANR) through the Programme d’Investissement d’Avenir (contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL Graduate school of pain) and Institut Thématique Interdisciplinaire NeuroStra (programme ITI 2021-2028 de l’Université de Strasbourg, du CNRS etc de l’Inserm)

ANR: Contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL Graduate School of pain

## **Introduction**

For humans, nonhuman primates and other social species, empathy is a deeply conserved neurobehavioral mechanism driving prosocial behaviors, thus improving survival on an evolutionary view (Decety et al., 2016; J. Panksepp & Panksepp, 2013). De Vignemont and Singer proposed to define empathy as the ability to share and understand someone else’s

affective states by witnessing or imagining the other person's affective emotions (De Vignemont & Singer, 2006). In particular, a specific and common situation when empathic processes can be triggered is when we encountered someone in pain. As pain plays a role in protecting the physical integrity of individuals, empathy to pain is therefore important for social species to recognize a partner's distress and elicit prosocial and consolation behaviors.

Empathy to pain was proved to be based on neural mechanisms highly conserved across species and to require cerebral areas commune to the pain matrix such as the anterior insular and the anterior cingulate cortex (Lamm et al., 2011; Rainville et al., 1997; Singer et al., 2004; Smith et al., 2021). Among the neurobiological systems involved in emotional and empathic process, the oxytocinergic system might be important. (Abu-Akel et al., 2015; Barraza & Zak, 2009; Bartz et al., 2010; Burkett et al., 2016). Oxytocin is indeed known to be involved both in non-social and social behaviors, including stress modulation, pain responses, learning, social memory and attachment, maternal behavior or even aggression. In the context of empathy, a study revealed that when participants were shown video clips of emotional scenes, their empathy scores were associated with elevated blood oxytocin levels (Barraza, 2009). Moreover, intranasal administration of oxytocin heightens empathic responses in men (Hurlemann, 2010) and improves emotion recognition, as assessed by the Reading the Mind in the Eyes Test (Domes, 2007).

In rodents, a primal form of empathy can be assessed and is referred to as emotional contagion or resonance and defined as a "convergence of inferred affective states between individuals" (J. B. Panksepp & Lahvis, 2011; J. Panksepp & Panksepp, 2013). An emotional contagion of pain was demonstrated to induce in both rats and mice a phenomena of social transfer of pain when an animal (named *the observer animal*) interacted with a familiar cage mate (not a stranger animal) submitted to a painful stimulus (named the *demonstrator* animal) (Langford et al., 2006; C. L. Li et al., 2018; Lu et al., 2018; Smith et al., 2016, 2021). Indeed, nociceptive hypersensitivity in the observer animals was showed after several pain models were performed in the demonstrator animal, including inflammatory pain, neuropathic pain, or event in the case of morphine and alcohol withdrawal (Langford et al., 2006; C. L. Li et al., 2018; Lu et al., 2018; Martin et al., 2015) (Smith et al., 2016, 2021).

In a developmental point of view, empathy processes start developing early in life but continue to mature during the first years, in parallel with cognitive and emotional processes. It is therefore possible that early life stress and adversity could impair the proper development of empathy pathways and responses, as suggested by a few clinical studies, but the specific mechanisms behind these alterations still require further investigation. For example, very and extremely premature infants at the ages of two and seven years present socio-emotional difficulties, including empathy, measured by the Infant-Toddler Social and Emotional Assessment or the Kids Empathy Development scale, respectively (Campbell et al., 2015; Spittle et al., 2009). In adulthood, a history of trauma also appears to be associated with lower scores of affective empathy, as measured by the Multifaceted Empathy Test and the Empathy Quotient (Grimm et al., 2017).

Neonatal Maternal separation (MS) is a well-known and characterized model of early life adversity that induces, among other consequences, alterations in nociceptive sensitivity and social behaviors but also a higher reactivity to stress and altered function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. These changes are associated with a dysfunction of the oxytocinergic analgesic system, and most of these behaviors can be rescued by the neonatal injection of oxytocin during the period of separation (Aisa et al., 2007; Gazzo et al., 2021; Melchior et al., 2018, 2021; Teissier et al., 2020). Some studies using rodents models of early life stress (i.e. early weaning at P14 or corticosterone in drinking water of lactating female during the first postnatal week) also demonstrated that social contagion of pain was affected in those animals (Kikusui & Mori, 2009; Laviola et al., 2021).

In this study, we then investigated the contagion of pain in control rats and in rats submitted to MS using a short and acute pain model induced by a formalin injection and a longer lasting inflammatory hypersensitivity following Freund's complete adjuvant (CFA) injection.

## **Materials and methods**

### **Animals**

All procedures were approved by the regional ethical committee regarding animal experimentation and conducted in accordance with EU regulations (APAFIS#36305-2022032215262844 v3). Experiments were conducted in the animal facility Chronobiotron UMS 3415 registered under the agreement E6721838. Pregnant Sprague-Dawley dams were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain Nuelles, France). After their arrival, the dams at E14 were carefully monitored for delivery. Postnatal day 0 (P0) refers to the day of birth. Mother and pups were housed in a temperature (22°C) and humidity (50 ± 20%) controlled room, under a 12h light-dark cycle (lights on at 7:00 am), with ad libitum access to food and tap water. Pups were weaned at P21 and housed 4 rats per cage before starting the experiments. Both males and females were used in this study.

### **Neonatal maternal separation protocol**

Dams and their litter were randomly assigned to the control (CTRL) or maternally separated (MS) group upon parturition. Litters from the MS group were separated from their home cage in which the dam remained for three hours per day, from P2 to P12, and placed in a separated room under a heating lamp to maintain their temperature. Separation was performed in the beginning of the afternoon, during the light phase of the 12:12h light/dark cycle. Litters from the control group remained undisturbed during that time.

### **Social transfer of pain test**

At the age of 8 weeks, rats were paired, co-housed for at least 2 weeks, accustomed to handling and randomly assigned to a role. The MS group was constituted of 13 pairs of animals and the CTRL group of 18 pairs. One cage mate was given the role of an observer (CO) and the second a demonstrator (CD) to whom a painful inflammatory stimulus was applied. The stimulus was a subcutaneous injection of Complete Freund's adjuvant (CFA) (100 µL of 1:1 CFA solution dissolved in saline obtained from Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany, 25G needle, 0.5mL syringe) in the right hind paw under isoflurane anesthesia (induction chamber, 3-4%

isoflurane). Same volume of saline under the same conditions was injected for CTRL groups. After injection, the CD returned to the home cage. Six hours after the injection, corresponding at the first effects of the CFA, the dyad interaction was filmed in a transparent cage to which it was previously accustomed. Their behaviors were evaluated by measuring the time (in seconds) devoted to allo-licking and allo-grooming from the CO to the CD which proved to be consolation behaviors based on empathy towards a partner in distress (Burkett et al., 2016; Lu et al., 2018). Allo-grooming is defined as head contact with the stressed individual's body or head while allo-licking is defined as head contact with the stressed individual's injured paw, accompanied by rhythmic head movement (Burkett et al., 2016). Backward-directed grooming (anogenital region or tail) was excluded from the study.

A second experiment was realized in a CTRL group ( $n = 6$ ) using formalin as a painful inflammatory stimulus (100  $\mu$ L of formalin solution dissolved in saline at 2,5% obtained from Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany, 25G needle, 0.5mL syringe) injected under the same conditions as described before.

## **Nociceptive tests**

Mechanical nociception was measured using calibrated forceps (Biobest, Vitrolles, France). The habituated animal was loosely restrained in a towel covering the upper body and progressive pressure was applied on a hind paw with the forceps until a withdrawal reflex was reached (Luis-Delgado et al., 2006).

Thermal nociception was measured using Plantar test (Ugo Basile, Italy), or Hargreaves method (Hargreaves et al., 1988). Rats, priorly accustomed to testing, were placed in Plexiglas boxes (20 cm x 25 cm x 45 cm) for 15 minutes of habituation. Each hind paw was then tested by applying a radiant heat to the plantar surface of the paw at an intensity of 80% (50-watt infrared bulb) until paw withdrawal. Withdrawal latency (in seconds) was recorded and considered the nociceptive threshold.

For both nociceptive modalities, each paw was tested three times and values were averaged. Baseline responses were recorded the social transfer test. Then, the nociceptive sensitivity of all animals was evaluated for two weeks after the injection of CFA. For the animals injected

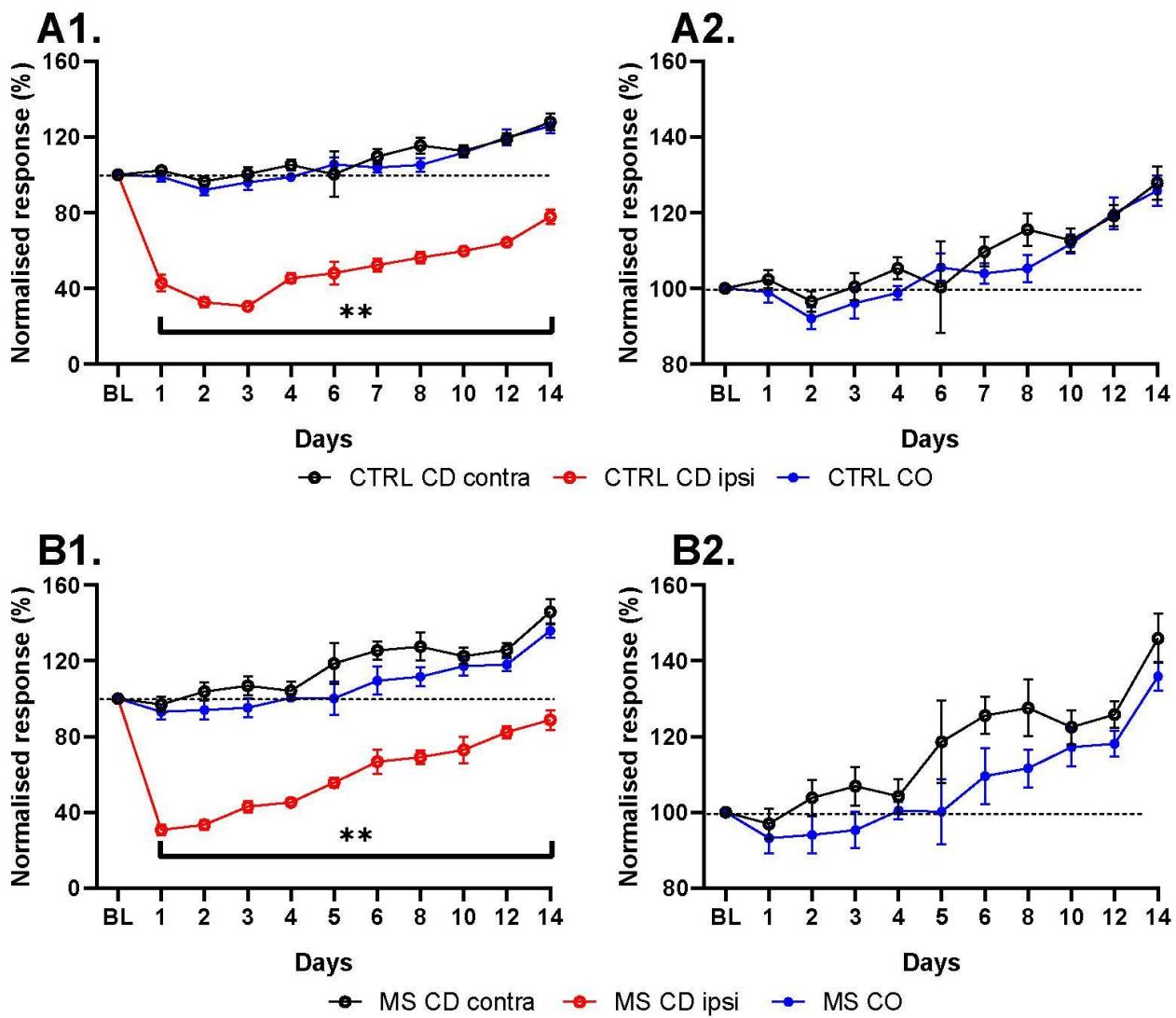
with formalin, the measures were done 30 min, 1h, 2h and 3h after the injection. The values of both nociceptive tests were normalized with baselines values equal to 100 %.

## **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software Inc. California, U.S.A.). Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Parametric analysis was used after verifying the normal distribution of the values for each test with a Shapiro-Wilk or a Kolmogorov-Smirnov test. Two way mixed effect analysis of variance (ANOVA) followed by the Sidak's multiple comparisons *post hoc* test was used to analyze social transfer of pain across time. Two-way ANOVA was used to compare the time spent in consolation behaviors between groups followed by the Sidak's multiple comparisons *post hoc* test. Student test was used to compare mean values of the CO at baseline and at day 2 after the injections. P value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

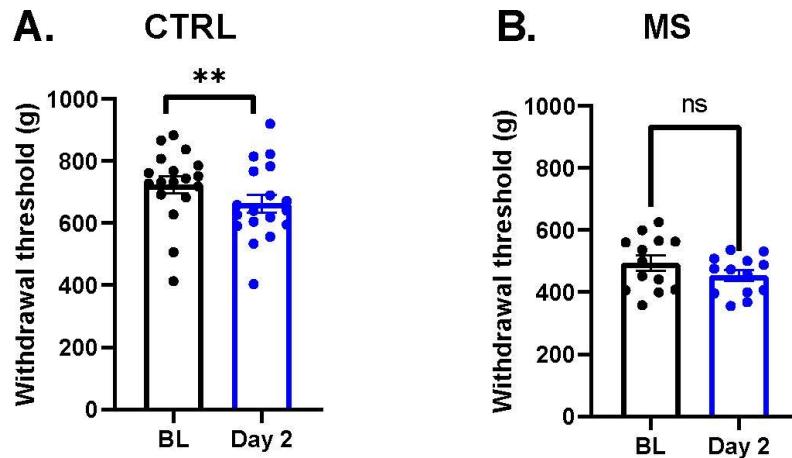
## **Results**

The injection of CFA (Figure 1), as expected, induced a mechanical hypersensitivity of the ipsilateral paw for 14 days in CD animals of both CTRL (Figure 1.A1) and MS groups (Figure 1.B1). After the injection, withdrawals thresholds of CD animals of the CTRL group dropped to  $42,8 \pm 19,4$  % and  $30,7 \pm 2,9$  % in MS animals, their thresholds were significantly lower compared to their contralateral paw in both groups (Two way mixed effect ANOVA matched by time, group x time,  $p<0.001$  for all factors in CTRL and MS groups). Regarding CO animals (Figure 1.A2 for CTRL and 1.B2 for MS), statistical analysis revealed no differences and no effect of the group when comparing their values with the contralateral paw of CD animals, in both CTRL and MS groups (Two way mixed effect ANOVA matched by time, group x time, for the group factor  $p=0.32$  in CTRL group and  $p=0.08$  in MS group).



**Figure 1: Observations of the effects of the injection of CFA in the CD animal on the empathic mechanical nociceptive response assessed with the calibrated forceps in the CO animal.** (A1) Comparison of mechanical nociception in CTRL group ( $n=18$ ) and (B1) in MS group ( $n=13$ ). (A2) Comparison of CO and CD contralateral paw in CTRL group and (B2) in MS group. Statistical test: Two way mixed effect ANOVA matched by time followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test (\*\*)  $p<0.001$  for comparison with the CD ipsilateral paw. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Contra: contralateral paw of CD animal. Ipsi: ipsilateral paw of CD animal (injected paw).

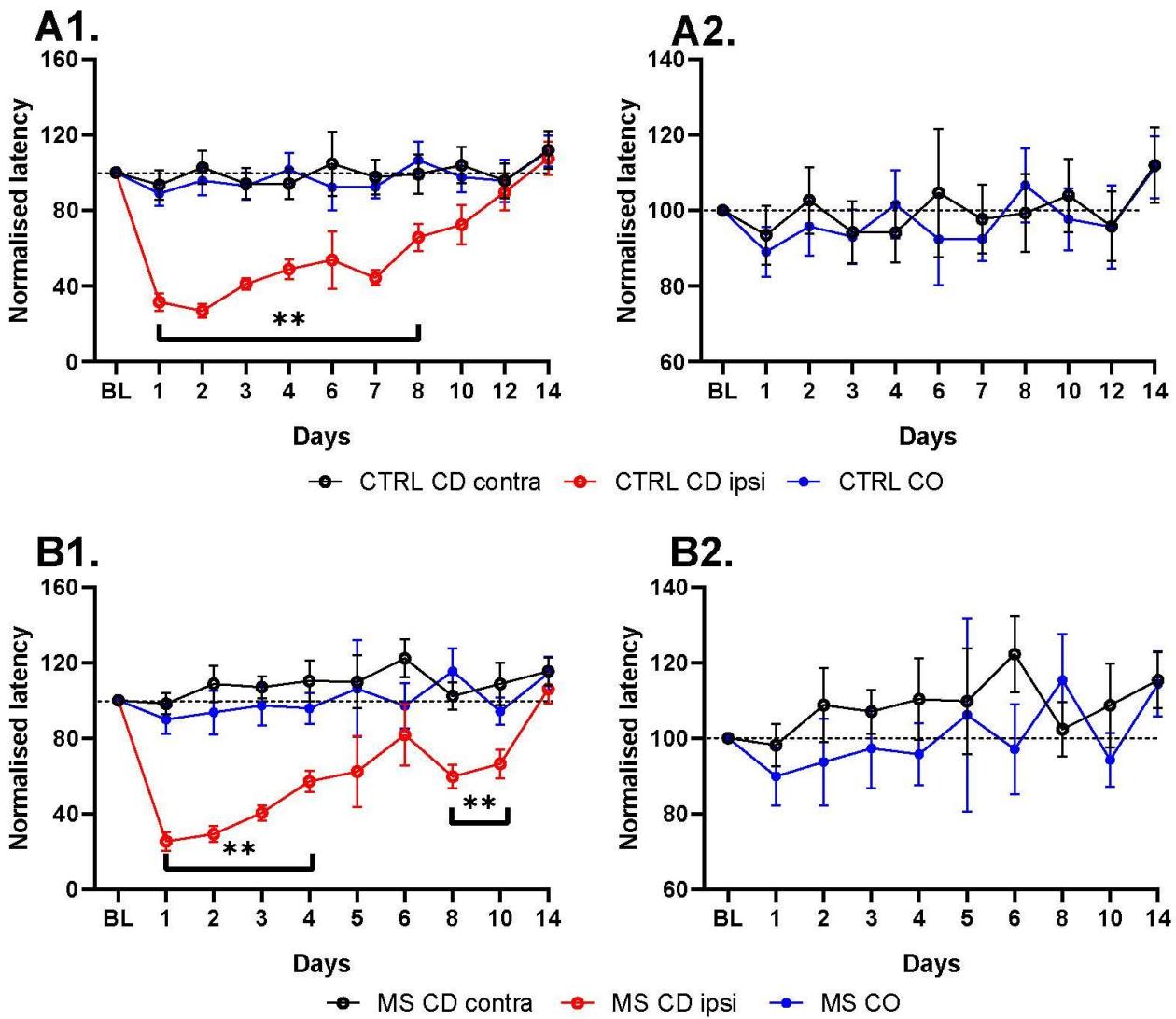
The lowest response was measured on day 2 after the injection in the CTRL group ( $663,1 \pm 28,74$  g vs  $724,0 \pm 27,39$  g at baseline) (Figure 2A.), which was statistically different from the baseline (Student test,  $t=3,429$ ,  $df=17$ ,  $p=0.0032$ ). For the MS group (Figure 2B.), the difference between the day 2 and the baseline was not statistically significant ( $453,6 \pm 17,07$  g vs  $493,3 \pm 24,22$  g at baseline) (Student test,  $t=1,605$ ,  $df=12$ ,  $p=0.1344$ ). This might suggest a very slight and short lasting contagion of mechanical pain in the CTRL group, but not in the MS group.



**Figure 2: Comparison of mechanical nociception at baseline and day 2 assessed with the calibrated forceps in CO animals.**

(A) Withdrawal thresholds (in g) of CTRL group ( $n=18$ ) and (B) MS group ( $n=13$ ). Statistical test: Student test, (\*\*\*)  $p<0.001$ . Data are expressed as means  $\pm$  SEM. BL: baseline. Ns: non-significant

Same evolution of nociceptive sensitivity and absence of effect on the CO was observed regarding thermal hot nociception (Figure 3). The injection of CFA induced a thermal hot hypersensitivity in both CTRL (Figure 3.A1) and MS groups (Figure 3.B1), as their response were significantly lower compared to their contralateral paw in CTRL and in MS group (Two way mixed effect ANOVA matched by time, group x time,  $p<0.001$  for both factors in CTRL and MS groups). There was no statistical difference between the values of the CO animals and the contralateral paw of CD animals in the two groups (Figure 3.A2 for CTRL and 3.B2 for MS) (Two way mixed effect ANOVA matched by time, group x time, for the group factor  $p=0.8308$  in CTRL group and  $p=0.504$  in MS group).

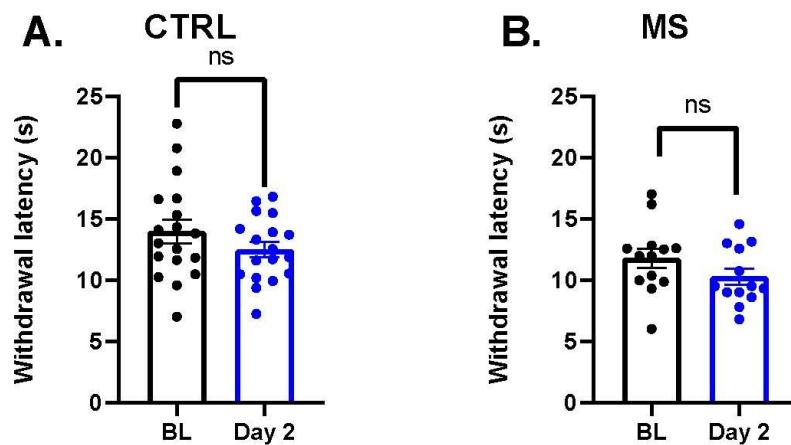


**Figure 3: Observations of the effects of the injection of CFA in the CD animal on the empathic thermal hot nociception response assessed with the plantar test in the CO animal.**

Comparison of thermal hot nociception for CD (ipsilateral and contralateral paws to CFA injection site) and CO animals of the (A1) CTRL group (n=18) and (B1) MS group (n=13). (A2) Comparison of CO and CD contralateral paw in CTRL group and (B2) in MS group. Statistical test: Two way mixed effect ANOVA matched by time followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test, (\*\*), p<0.001 for comparison with the CD ipsilateral paw. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Contra: contralateral paw of CD animal. Ipsi: ipsilateral paw of CD animal (injected paw).

The lowest value was measured on day 2 after the injection (Figure 4) in the CTRL group ( $12,49 \pm 0,62$  s vs  $13,97 \pm 0,95$  s at baseline) and in the MS group ( $10,27 \pm 0,65$  s vs  $11,78 \pm 0,79$  s at baseline) but was not statistically different when compared to the baselines (Student test,  $t=1,477$ ,  $df=17$ ,  $p=0.158$  for CTRL and  $t=1,489$ ,  $df=12$ ,  $p=0.162$  for MS).

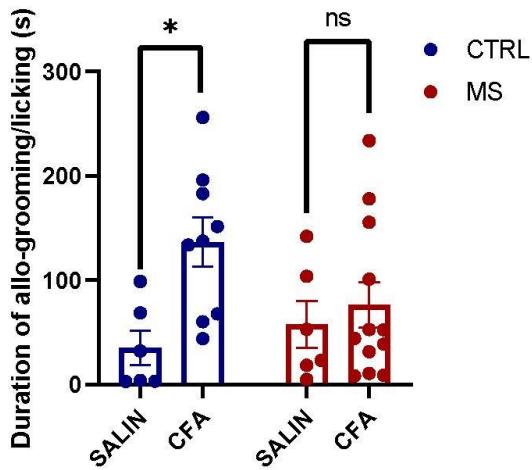
The continuous interaction with a cage mate in pain did not induce a mechanical or a thermal hypersensitivity in CO animals, regardless of the neonatal treatment.



**Figure 4: Comparison of thermal hot nociception at baseline and day 2 assessed with the plantar test in CO animals.**

(A) Withdrawal latency (in s) of CTRL group ( $n=18$ ) and (B) MS group ( $n=13$ ). Statistical test: Student test. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. BL: baseline. Ns: non-significant

The study of the behavior of the animals (Figure 5) after the injection of CFA demonstrated that CO animals of CTRL group spent significantly more time on consolation behaviors compared to the saline condition (Two-way ANOVA group x injection,  $F (1, 29) = 6,461$ ,  $p=0,0166$  for the group factor, followed by Sidak's multiple comparisons test,  $p = 0,0122$ ). However, no differences were observed when comparing the behaviors of the MS groups.

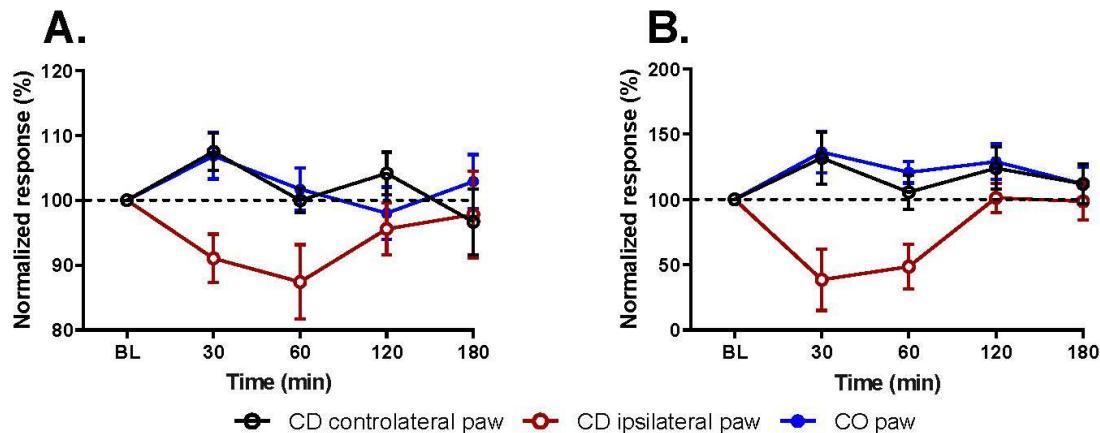


**Figure 5: Comparison of consolation behaviors**

Duration of allo-grooming and allo-licking behaviours (in s) (n=6 for salin condition of both groups; n=9 for CTRL-CFA and 12 for MS-CFA).

Statistical test: Two-way ANOVA group x injection,  $F (1, 29) = 6,461$ ,  $p=0,0166$  for the group factor, followed by Sidak's multiple comparisons test,  $p = 0,0122$ .

In the second part of the study, we used formalin to induce an acute and short pain in the paw of CD animals of a CTRL group (Figure 5). The formalin injection significantly reduced the withdrawal threshold of the CD animal to  $91,06 \pm 3,76$  % for mechanical (Figure 5A.) and  $38,54 \pm 23,5$  % for thermal hot nociception (Figure 5B.) 30 min after the injection (Two way ANOVA matched by time, group x time, interaction  $p=0,04$  for mechanical nociception and group factor  $p=0,005$  for thermal hot nociception). Here, we also report no statistical differences between the values of CO animals and CD animals (contralateral paw) for the mechanical and thermal hot nociception after they interacted (Two way mixed effect ANOVA matched by time, group factor  $p=0,67$  for mechanical and  $p=0,33$  for thermal hot nociception).



**Figure 6: Observations of the effects of the injection of formalin in the CD animal on the empathic nociceptive response in the CO animal.** (A) Comparison of mechanical nociception (calibrated forceps) and (B) of thermal hot nociception (plantar test) in a CTRL group (n=6). Statistical test: Two way ANOVA matched by time followed by Tukey's multiple comparisons *post hoc* test,  $p=0,04$  for mechanical nociception,  $p=0,05$  for thermal hot nociception for comparison with the CD ipsilateral paw. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. Contra: contralateral paw of CD animal. Ipsi: ipsilateral paw of CD animal (injected paw).

## Discussion

In this study evaluating the contagion of pain we report no significant effect of the interaction with a cage mate in pain after CFA or formalin injection on nociceptive sensitivity in CO animals of all groups. In the whole experiment, a single difference was observed between the baseline values and the values at day 2 of mechanical nociception in the CTRL group housed with a CD injected with CFA. However, only CTRL CO animals displayed consolation behaviors towards the CD animal after the injection. When comparing the time spent in consolation behaviors of MS and CTRL groups, we observed an increase only in the CTRL group. We conclude from this last experiment that MS altered consolation behaviors in rats.

Our results are in contradiction with the literature, as multiple studies demonstrated the presence of contagious pain hypersensitivity in mice co-housed with a familiar cage mate suffering from neuropathic pain, an injection of acetic acid or CFA, but also undergoing opiate or alcohol withdrawal-induced hypersensitivity (Baptista-de-Souza et al., 2015; Langford et al., 2006; Smith et al., 2016). A number of studies in rats also observed this phenomenon of pain

contagion using models of spared-nerve injury induced neuropathic pain, injection of CFA, bee venom or formalin (C. L. Li et al., 2018; Z. Li et al., 2014; Lu et al., 2018; Luo et al., 2020; Nazeri et al., 2019). In all these cited studies, the most important effects were observed for acute pain stimuli that induced displayable and visually identifiable spontaneous pain behaviors, such as acetic acid, bee venom, or formalin. However, in our experimental conditions, using formalin, we did not observe a significant modification of pain sensitivity in CO rats whether we tested mechanical or thermal hot nociception.

The presence of consolation behaviors in CTRL groups indicates the possibility that the contagion of pain could not be observed because of testing conditions. Although all animals were habituated to the test of calibrated forceps, the immobilization and restrain of the rat, that is unnecessary when performing Von frey filaments test, may have provoked a stress-induced analgesia sufficient enough to dampen the effect of pain contagion (Butler & Finn, 2009; Costa et al., 2005). The test of calibrated forceps is experimenter dependent (incremental pressure is applied by the experimenter until withdrawal reflex) whereas the Von Frey filaments test uses multiple fixed pressures (Barrot, 2012; Luis-Delgado et al., 2006; Modi et al., 2023) however the use of calibrated forceps was validated in multiple pain models and demonstrated to have a good sensitivity and low data variability (Barrot, 2012; Juif et al., 2016; Luis-Delgado et al., 2006; Melchior et al., 2018). All nociceptive tests presents inconveniences and advantages (Barrot, 2012; Modi et al., 2023), but calibrated forceps are sensitive enough to measure a hypersensitivity and the absence of significant effect using calibrated forceps or Hargreaves method indicates that the test of social transfer of pain is delicate to perform and may be sensitive to other factors. A study of Martin and collaborators demonstrated that stress can directly affect emotional contagion of pain, in both humans and mice (Martin et al., 2015). In this study, a 30 min restraint stress (inducing stress-induced analgesia) abolished the effect of pain contagion in mice cage mates. Moreover, a pharmacological blockade (metyrapone pre-treatment) of glucocorticoid synthesis in humans and mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in mice elicited the expression of emotional contagion of pain in stranger dyads of both species. Therefore, any supplementary, unexpected or non-identified stress during the experiments could have influenced the results.

Another limitation to behavioural studies is inter-individual variability. Rats, like other species, present genetic and behavioural differences that could influence their responses to pain or stress (Curé & Rolinat, 1992; Lariviere & Mogil, 2010; Pradhan et al., 1990; Tuttle et al., 2018). A higher number of animals may be necessary to replicate the results of the studies on contagion of pain or define a cluster of low and high responder animals. No sex differences were observed in contagion of pain in mice and rat (Langford et al., 2006; Martin et al., 2015; Smith et al., 2016), however, our number of animal in this study does not permit an analysis on the effect of sex to point it as a factor of variability.

As no effect on the nociceptive sensitivity of the CO rats after interaction with the CD was observed, we cannot conclude on the impact of MS on contagion of pain. However, consolation behaviours were present only in the CTRL group demonstrating that empathy-related abilities were affected by MS. MS is considered a model of early life stress mimicking the effect of abuse in humans (Kuhlman, 2024; Murthy & Gould, 2018) and as matter fact, impairments of empathy were observed for major issues such as very and extremely preterm birth and childhood traumas in humans (Campbell et al., 2015; Grimm et al., 2017; Spittle et al., 2009). In animals models, it was also observed in models of early weaning (P14) and severe perinatal stress conditions (exposition to abnormal levels of corticosterone during the first week of lactation) (Kikusui & Mori, 2009; Laviola et al., 2021).

Contrary to literature on the social transfer of pain, we report no modification of nociceptive sensitivity in CO animals (except for a unique minor difference in the CTRL group on day 2) under our conditions in both groups, however an impairment of prosocial behaviors by MS was observed. Our study also highlights the importance of choosing specific nociceptive testing tools and reducing the effect of inter-individual variability by choosing a larger n, with several different litters for a better reproducibility of data.

## **References**

- Abu-Akel, A., Palgi, S., Klein, E., Decety, J., & Shamay-Tsoory, S. (2015). Oxytocin increases empathy to pain when adopting the other- but not the self-perspective. *Social Neuroscience*, 10(1), 7-15. <https://doi.org/10.1080/17470919.2014.948637>

- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., & Ramirez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256-266. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.12.013>
- Baptista-de-Souza, D., Nunciato, A. C., Pereira, B. C., Fachinni, G., Zaniboni, C. R., & Canto-de-Souza, A. (2015). Mice undergoing neuropathic pain induce anxiogenic-like effects and hypernociception in cagemates. *Behavioural Pharmacology*, 26(7), 664-672. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000170>
- Barraza, J. A., & Zak, P. J. (2009). Empathy toward Strangers Triggers Oxytocin Release and Subsequent Generosity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1167(1), 182-189. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04504.x>
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>
- Bartz, J. A., Zaki, J., Bolger, N., Hollander, E., Ludwig, N. N., Kolevzon, A., & Ochsner, K. N. (2010). Oxytocin Selectively Improves Empathic Accuracy. *Psychological Science*, 21(10), 1426-1428. <https://doi.org/10.1177/0956797610383439>
- Burkett, J. P., Andari, E., Johnson, Z. V., Curry, D. C., de Waal, F. B. M., & Young, L. J. (2016). Oxytocin-dependent consolation behavior in rodents. *Science*, 351(6271), 375-378. <https://doi.org/10.1126/science.aac4785>
- Butler, R. K., & Finn, D. P. (2009). Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology*, 88(3), 184-202. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.003>
- Campbell, C., Horlin, C., Reid, C., McMichael, J., Forrest, L., Brydges, C., French, N., & Anderson, M. (2015). How do you think she feels? Vulnerability in empathy and the role of attention in school-aged children born extremely preterm. *The British Journal of Developmental Psychology*, 33(3), 312-323. <https://doi.org/10.1111/bjdp.12091>
- Costa, A., Smeraldi, A., Tassorelli, C., Greco, R., & Nappi, G. (2005). Effects of acute and chronic restraint stress on nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *Neuroscience Letters*, 383(1-2), 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.03.026>
- Curé, M., & Rolinat, J. P. (1992). Behavioral heterogeneity in Sprague-Dawley rats. *Physiology & Behavior*, 51(4), 771-774. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90114-H](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90114-H)
- De Vignemont, F., & Singer, T. (2006). The empathic brain : How, when and why? *Trends in Cognitive Sciences*, 10(10), 435-441. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2006.08.008>
- Decety, J., Bartal, I. B.-A., Uzefovsky, F., & Knafo-Noam, A. (2016). Empathy as a driver of prosocial behaviour : Highly conserved neurobehavioural mechanisms across species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1686), 20150077. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0077>
- Gazzo, G., Melchior, M., Caussaint, A., Gieré, C., Lelièvre, V., & Poisbeau, P. (2021). Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 92, 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.010>
- Godinho, F., Faillenot, I., Perchet, C., Frot, M., Magnin, M., & Garcia-Larrea, L. (2012). How the pain of others enhances our pain : Searching the cerebral correlates of « compassionate

- hyperalgesia ». *European Journal of Pain (London, England)*, 16(5), 748-759.  
<https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2011.00039.x>
- Grimm, S., Wirth, K., Fan, Y., Weigand, A., Gärtner, M., Feeser, M., Dziobek, I., Bajbouj, M., & Aust, S. (2017). The interaction of corticotropin-releasing hormone receptor gene and early life stress on emotional empathy. *Behavioural Brain Research*, 329, 180-185.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.047>
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *PAIN*, 32(1), 77.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7)
- Juif, P. E., Salio, C., Zell, V., Melchior, M., Lacaud, A., Petit-Demouliere, N., Ferrini, F., Darbon, P., Hanesch, U., Anton, F., Merighi, A., Lelievre, V., & Poisbeau, P. (2016). Peripheral and central alterations affecting spinal nociceptive processing and pain at adulthood in rats exposed to neonatal maternal deprivation. *Eur J Neurosci*, 44(3), 1952-1962.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.13294>
- Kikusui, T., & Mori, Y. (2009). Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(4), 427-431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01837.x>
- Kuhlman, K. R. (2024). Pitfalls and potential : Translating the two-hit model of early life stress from pre-clinical non-human experiments to human samples. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 35, 100711. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2023.100711>
- Lamm, C., Decety, J., & Singer, T. (2011). Meta-analytic evidence for common and distinct neural networks associated with directly experienced pain and empathy for pain. *NeuroImage*, 54(3), 2492-2502. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.10.014>
- Langford, D. J., Crager, S. E., Shehzad, Z., Smith, S. B., Sotocinal, S. G., Levenstadt, J. S., Chanda, M. L., Levitin, D. J., & Mogil, J. S. (2006). Social Modulation of Pain as Evidence for Empathy in Mice. *Science*, 312(5782), 1967-1970. <https://doi.org/10.1126/science.1128322>
- Lariviere, W. R., & Mogil, J. S. (2010). The Genetics of Pain and Analgesia in Laboratory Animals. In A. Szallasi (Ed.), *Analgesia : Methods and Protocols* (p. 261-278). Humana Press.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-323-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-323-7_20)
- Laviola, G., Busdraghi, L. M., Meschino, N., Petrella, C., & Fiore, M. (2021). Aberrant Early in Life Stimulation of the Stress-Response System Affects Emotional Contagion and Oxytocin Regulation in Adult Male Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), Article 9.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22095039>
- Li, C. L., Yu, Y., He, T., Wang, R. R., Geng, K. W., Du, R., Luo, W. J., Wei, N., Wang, X. L., Wang, Y., Yang, Y., Yu, Y. Q., & Chen, J. (2018). Validating Rat Model of Empathy for Pain : Effects of Pain Expressions in Social Partners. *Front Behav Neurosci*, 12, 242.  
<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00242>
- Li, Z., Lu, Y.-F., Li, C.-L., Wang, Y., Sun, W., He, T., Chen, X.-F., Wang, X.-L., & Chen, J. (2014). Social interaction with a cagemate in pain facilitates subsequent spinal nociception via activation of the medial prefrontal cortex in rats. *PAIN*®, 155(7), 1253-1261.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.03.019>

- Lu, Y. F., Ren, B., Ling, B. F., Zhang, J., Xu, C., & Li, Z. (2018). Social interaction with a cagemate in pain increases allogrooming and induces pain hypersensitivity in the observer rats. *Neurosci Lett*, 662, 385-388. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.10.063>
- Luis-Delgado, O. E., Barrot, M., Rodeau, J. L., Schott, G., Benbouzid, M., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M. J., & Lasbennes, F. (2006). Calibrated forceps : A sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain*, 7(1), 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.07.011>
- Luo, W.-J., Li, C.-L., Geng, K.-W., Wang, X.-L., Du, R., Yu, Y., Wei, N., He, T., Wang, Y., Yu, Y.-Q., & Chen, J. (2020). The similar past pain experience evokes both observational contagious pain and consolation in stranger rat observers. *Neuroscience Letters*, 722, 134840. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134840>
- Martin, L. J., Hathaway, G., Isbester, K., Mirali, S., Acland, E. L., Niederstrasser, N., Slepian, P. M., Trost, Z., Bartz, J. A., Sapolsky, R. M., Sternberg, W. F., Levitin, D. J., & Mogil, J. S. (2015). Reducing Social Stress Elicits Emotional Contagion of Pain in Mouse and Human Strangers. *Current Biology*, 25(3), 326-332. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.028>
- Melchior, M., Juif, P. E., Gazzo, G., Petit-Demouliere, N., Chavant, V., Lacaud, A., Goumon, Y., Charlet, A., Lelievre, V., & Poisbeau, P. (2018). Pharmacological rescue of nociceptive hypersensitivity and oxytocin analgesia impairment in a rat model of neonatal maternal separation. *Pain*, 159(12), 2630-2640. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001375>
- Melchior, M., Kuhn, P., & Poisbeau, P. (2021). The burden of early life stress on the nociceptive system development and pain responses. *Eur J Neurosci*. <https://doi.org/10.1111/ejn.15153>
- Modi, A. D., Parekh, A., & Pancholi, Y. N. (2023). Evaluating pain behaviours : Widely used mechanical and thermal methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, 446, 114417. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114417>
- Murthy, S., & Gould, E. (2018). Early Life Stress in Rodents : Animal Models of Illness or Resilience? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00157>
- Nazeri, M., Nezhadi, A., & Shabani, M. (2019). Role of Opioid System in Empathy-like Behaviours in Rats. *Addiction & Health*, 11(4), 216. <https://doi.org/10.22122/ahj.v11i4.243>
- Panksepp, J. B., & Lahvis, G. P. (2011). Rodent empathy and affective neuroscience. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(9), 1864-1875. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.05.013>
- Panksepp, J., & Panksepp, J. B. (2013). Toward a cross-species understanding of empathy. *Trends Neurosci*, 36(8), 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.009>
- Pradhan, N., Arunasmitha, S., & Udaya, H. B. (1990). Behavioral and neurochemical differences in an inbred strain of rats. *Physiology & Behavior*, 47(4), 705-708. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90081-E](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90081-E)
- Rainville, P., Duncan, G. H., Price, D. D., Carrier, B., & Bushnell, M. C. (1997). Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5328), 968-971. <https://doi.org/10.1126/science.277.5328.968>
- Singer, T., Seymour, B., O'Doherty, J., Kaube, H., Dolan, R. J., & Frith, C. D. (2004). Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5661), 1157-1162. <https://doi.org/10.1126/science.1093535>

- Smith, M. L., Asada, N., & Malenka, R. C. (2021). Anterior cingulate inputs to nucleus accumbens control the social transfer of pain and analgesia. *Science*, 371(6525), 153-159. <https://doi.org/10.1126/science.abe3040>
- Smith, M. L., Hostetler, C. M., Heinricher, M. M., & Ryabinin, A. E. (2016). Social transfer of pain in mice. *Science Advances*, 2(10), e1600855. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600855>
- Spittle, A. J., Treyvaud, K., Doyle, L. W., Roberts, G., Lee, K. J., Inder, T. E., Cheong, J. L. Y., Hunt, R. W., Newnham, C. A., & Anderson, P. J. (2009). Early emergence of behavior and social-emotional problems in very preterm infants. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 48(9), 909-918. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e3181af8235>
- Teissier, A., Le Magueresse, C., Olusakin, J., Andrade da Costa, B. L. S., De Stasi, A. M., Bacci, A., Imamura Kawasawa, Y., Vaidya, V. A., & Gaspar, P. (2020). Early-life stress impairs postnatal oligodendrogenesis and adult emotional behaviour through activity-dependent mechanisms. *Mol Psychiatry*, 25(6), 1159-1174. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0493-2>
- Tuttle, A. H., Philip, V. M., Chesler, E. J., & Mogil, J. S. (2018). Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nature Methods*, 15(12), 994-996. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0224-7>
- Witt, A., Theurel, A., Tolsa, C. B., Lejeune, F., Fernandes, L., de Jonge, L. van H., Monnier, M., Bickle Graz, M., Barisnikov, K., Gentaz, E., & Hüppi, P. S. (2014). Emotional and effortful control abilities in 42-month-old very preterm and full-term children. *Early Human Development*, 90(10), 565-569. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.07.008>

### Article 3 : Impact de la séparation maternelle néonatale sur le développement de la douleur neuropathique induite par la constriction chronique du nerf sciatique chez le rat adulte

Dans cette dernière étude, nous avons évalué l'impact de la SMN à l'âge adulte sur un type de douleur particulier : la douleur neuropathique. En effet, l'adversité précoce chez l'Homme est considérée comme un facteur de risque dans le développement de douleur chronique et des comorbidités associés. Notre laboratoire utilise un modèle de neuropathie induite par une constriction du nerf sciatique par la pose d'un manchon en polyéthylène appelé « cuff ». Cette neuropathie induit en plus des hypersensibilités nociceptives, des comorbidités de type anxi-dépressives chez la souris mais pas chez le rat (résultats du laboratoire non publiés). L'hypothèse testée dans cette dernière étude est la suivante : la SMN serait un facteur aggravant dans le développement de l'hypersensibilité mécanique et de l'allodynie au froid induite par la neuropathie et provoquerait potentiellement l'apparition de comorbidités chez le rat.

Après induction de la neuropathie chez les animaux contrôles et SMN, nous avons évalué la sensibilité mécanique nociceptive avec le test de la pince calibrée et l'allodynie au froid avec le test acétone. Pour l'évaluation des autres comportements, nous avons effectué un test de conditionnement de double-aversion (nouvellement validé et publié par notre équipe), un test de labyrinthe en croix surélevé, de sociabilité, de préférence à la nouveauté sociale, plusieurs tests évaluant différents types de mémoire et pour l'évaluation des comportements de types dépressifs, un test de nage forcée et un « splash test ».

Contrairement à notre hypothèse initiale, les animaux SMN présentaient un développement retardé de la neuropathie avec des symptômes d'hypersensibilité moins intense. Cependant, à cause d'un comportement inattendu chez nos animaux contrôle, nous n'avons pas pu tirer de conclusions claires sur l'impact de la SMN ou la neuropathie (ou de leur interaction) pour les autres comportements. Une réévaluation de ces comportements est en cours dans notre laboratoire.

Pour cette dernière étude, j'ai effectué les chirurgies ainsi que l'intégralité des tests et leur analyse.

Impact of neonatal maternal separation on the development of neuropathic pain induced by chronic constriction of the sciatic nerve in later life in rats

Yasmine Brik<sup>1</sup>, Pierrick Poisbeau<sup>1</sup> and Meggane Melchior<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Centre National de la recherche Scientifique et Université de Strasbourg, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (CNRS UMR 7364) – 12 rue Goethe, 67000, Strasbourg, France

*\*Corresponding author:*

Meggane Melchior, PhD, University of Strasbourg, CNRS UMR 7364, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives, Research group “Life adversity and pain” – 12 rue Goethe, 67000 Strasbourg, France. Email: [mmelchior@unistra.fr](mailto:mmelchior@unistra.fr)

Acknowledgments: This work was funded by Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg and Fédération pour la Recherche sur le Cerveau (FRC 2019). We thank the following research programs of excellence for their support: Fondation Université de Strasbourg through the Strasbourg Pain Initiative, French National Research Agency (ANR) through the Programme d’Investissement d’Avenir (contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL Graduate school of pain) and Institut Thématique Interdisciplinaire NeuroStra (programme ITI 2021-2028 de l’Université de Strasbourg, du CNRS etc de l’Inserm)

ANR: Contract ANR-17-EURE-0022, EURIDOL Graduate School of pain

## **Introduction**

Chronic neuropathic pain has a huge impact on the quality of life of patients, generating, in addition to the sensory and pain symptoms, several comorbidities including an increase in anxiety levels, depression symptoms and cognitive impairments (Bushnell et al., 2013; Colloca et al., 2017). Clinical evidence suggests that prematurity and, more broadly, aversive events in early life are risk factors for the development of neurological pathologies in adulthood, affecting cognitive and emotional functions (McEwen, 2008; McLaughlin et al., 2019; Miller et al., 2011; Moster et al., 2008) also pain sensitivity (Fitzgerald, 2005; Melchior et al., 2021). Several studies and meta-analysis have shown that individuals who have experienced early life stress (ELS) have an increased risk of developing chronic pain (Antoniou et al., 2023; Burke et al., 2017; Davis et al., 2005). For example, a great number of patients suffering from migraines or irritable bowel syndromes report a history of childhood maltreatment (Ross, 2005; Tietjen et al., 2016).

In terms of mechanisms, numerous studies have demonstrated that ELS also has repercussions on the functions of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune system by inducing a higher systemic inflammation and a dysregulation of immune cellular functions (Fagundes et al., 2013; Heim et al., 2010).

Neonatal maternal separation (MS) in rodents is a well characterized model of ELS and consists of a daily separation of 3h per day from the second postnatal day (P2) to P12, modelling childhood neglect or early maternal separation that could occur for example following preterm birth in humans (Kuhlman, 2024). MS induces at adulthood abnormal responses to stress and hyper-reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis as well as anxiety-like symptoms and social deficits (Kikusui et al., 2016; Ladd et al., 2004; Plotsky & Meaney, 1993). It also impairs pain sensitivity, leading to both visceral (Coutinho et al., 2002) and somatic hyperalgesia associated with a functional deficit of inhibitory pain control (Juif et al., 2016; Melchior et al., 2018). Our team also previously described a hypersensitivity to inflammatory pain induced by carrageenan injections in adult rats submitted to MS (Melchior et al., 2018).

However, to our knowledge, the impact of MS as an aggravating factor in the case of neuropathic pain and associated comorbidities in rats has received limited research attention.

This study aims to evaluate the impact of MS on the development of neuropathic pain symptoms and behavioural comorbidities, using the cuff induced neuropathy model, known to induce a mechanical hypersensitivity and cold allodynia for at least forty days (Benbouzid et al., 2008; Mosconi & Kruger, 1996) (Aouad et al., 2014). Studies on mice using this model of neuropathy demonstrated that, in addition to the nociceptive hypersensitivity, animals developed anxiety-like behaviours 4 weeks after induction of the neuropathy and depressive-like behaviours after 6 weeks (Benbouzid et al., 2008; Yalcin et al., 2011). Our hypothesis was that MS would constitute an aggravating factor, just like in the model of inflammatory pain, in the development of neuropathic pain in terms of sensory, emotional and cognitive symptoms, leading thus to anxi-depressive comorbidities and cognitive disorders, usually not detectable in Sprague Dawley rats subjected to this type of neuropathy (Hestehave et al., 2020; Hubbard et al., 2015; Kontinen et al., 1999; Okun et al., 2016). This hypothesis stems from a reflexion borrowed from the double hit theory first described by Knudson but then adapted to a multitude of research fields. Here, the first "hit" would be MS, setting up a potential ground of vulnerability, and the second "hit" would be the neuropathy in adulthood, which together would increase the consequences of the neuropathy.

We therefore characterized the thermal and mechanical nociceptive responses, anxiety and depressive-like behaviours and cognitive abilities related to sociability and memory of animals subjected to MS following the establishment of the cuff induced neuropathy. Results, contrary to our hypothesis, seem to demonstrate that MS, rather than being an aggravating factor in neuropathies and associated comorbidities, makes Sprague Dawley rats resilient against it.

## **Materials and methods**

### **Animals and neonatal maternal separation protocol**

Pregnant Sprague-Dawley dams were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain Nuelles, France). After their arrival at E14, the dams were carefully monitored for

delivery. Postnatal day 0 (P0) refers to the day of birth. Mother and pups were housed in a temperature (22°C) and humidity (50 ± 20%) controlled room, under a 12h light-dark cycle (lights on at 7:00 am), with ad libitum access to food and tap water. Dams and their litter were randomly assigned to the control (CTRL) or maternally separated (MS) group upon parturition. Litters from the MS group were separated from their home cage in which the dam remained for three hours per day, from P2 to P12, and placed in a separated room under a heating lamp to maintain their temperature. Separation was performed in the beginning of the afternoon, during the light phase of the 12:12h light/dark cycle. Litters from the control group remained undisturbed during that time. Pups were weaned at P21 and housed 4 rats per cage. Both males and females were used in this study. Before starting the experiments 7-week-old animals were habituated to the experimenter and experimental rooms for a week.

All procedures were approved by the regional ethical committee regarding animal experimentation and conducted in accordance with EU regulations (APAFIS# 42995-2023041117036342 v4). Experiments were conducted in the animal facility Chronobiotron UMS 3415 registered under the agreement E6721838.

### **Induction of neuropathy by chronic compression of the sciatic nerve (Cuff model)**

The cuff model of neuropathic pain is induced by chronic compression of the sciatic nerve following placement of a polythene cuff around the main branch of the sciatic nerve (Benbouzid et al., 2008; Mosconi & Kruger, 1996). Briefly, in aseptic conditions, animals were anesthetized with isoflurane at 4% pushed by compressed air at a flow rate of 700 mL /min (Ventoflurane®, Vibrac, France). The posterior right leg was shaved and disinfected and an incision of 1 to 2cm was made on the skin at thigh level. The common trunk of the sciatic nerve was exposed using two autoclaved toothpicks. A polyethylene cuff (1-mm-long splitted section; ID = 0.86 mm, OD = 1.27 mm; PE-90, Harvard Apparatus, Les Ulis, France) was implanted unilaterally around the main branch of the sciatic nerve. The wound was then sutured with a nylon suture (Ethilon 4-0, Ethicon, USA) and the animal was placed in a recovery cage under a heating lamp. For the control condition, the sham group underwent the same

procedure except for the cuff placement. Animals were carefully monitored daily after the surgery. The number of animals per group was: n=10 cuff and 7 sham for the MS group; n=9 cuff and 8 sham for the CTRL group.

### **Measure of mechanical nociception and cold allodynia**

Nociceptive baselines of all animals were measured during a week before surgery, twice a week after surgery for three weeks, and then once a week for the last two weeks. Mechanical nociception was measured using calibrated forceps (Bioseb, Vitrolles, France) (Luis-Delgado et al., 2006). The priorly accustomed animal was loosely restrained in a towel covering the upper body and an increasing pressure was applied to the hind paw with the forceps until a withdrawal reaction was reached. Withdrawal pressure was noted. The procedure was repeated 3 times per paw and measures were averaged for each paw. The data is presented as normalized values; the value of 1 was attributed to the baseline of each animal for mechanical nociception.

The acetone test was used to assess cold allodynia (Yoon et al., 1994). Rats, previously accustomed to testing, were placed in plexiglas boxes (20 cm x 25 cm x 45 cm) for 15 minutes of familiarization. A drop of acetone was applied to the arch of each hind paw provoking a cold sensation when it evaporates. The behavior of the animal in response to it was scored on a scale from 0 to 5 as follows: 0 = no reaction, 1 = brief withdrawal or sniffing, 2 = jumping or shaking of stimulated paw, 3 = multiple withdrawals or shaking, 4 = lively withdrawal, prolonged licking, shaking or jumping, 5 = protection of paw, "guarding" behavior. Both paws were tested, the drop was applied three times alternating between paws, at 5-minute intervals, scores were summed for each paw.

### **Behavioral and cognitive tests**

#### **Sensory Affective Double Avoidance Conditioning test**

The Sensory Affective Double Avoidance Conditioning (SADAC) test is a newly validated adaptation of the Thermal Place Preference Test (Ugo Basile, Italy) (Gieré et al., 2022). It consists of two Plexiglas compartments (height: 25.5cm, diameter: 20 cm), a bright (120 lux to

create an aversive environment) and a dark one (wrapped in a transparent dark red plastic film as rats cannot see this color), both resting on temperature-controlled plates that the animal can freely explore the entire 10 minutes of the test. At the start of the test, the animal was placed in the dark compartment of the chamber where the surface temperature was 25°C for a 5 minute habituation period. After 5 minutes, the dynamic ramp was triggered in the dark compartment at a speed of 7°C/min to reach a nociceptive temperature of 52°C. A cut-off at 30 s during the last minute of the test was set in case the animal remained in the dark compartment at 52°C. The temperature of the plate of the bright compartment was maintained at 25°C. The animal had to resolve a conflict between its aversion to the bright compartment and the motivation to escape the noxious hot stimulation in the dark compartment. The test was filmed, and the behavior of the animal was manually scored to assess:

- Time spent in each compartment throughout the test
- Temperature of first nociceptive behavior (observation of jumping and flinching or paw withdrawal, licking or shaking)
- Temperature of definitive escape from the heated compartment (dark compartment)

The test was repeated once, one hour after the first exposure to assess the learning effect. It was performed one week after surgery.

The SADAC test permits multiple evaluations within one test. For a better conceptual analysis, the test was divided into three different periods. Time spent in the dark compartment before any increase of temperature (5 first minutes of the test), is called **baseline period**. Next comes the **anticipation period** (from minute 5 to 7) when the heating ramp starts and reaches the nociceptive temperature of 42°C. The last period (until minute 10) is the **tolerance period** during which the floor of the dark compartment temperature is above 42°C.

To exploit these results, the area under the curve (AUC) of time spent in the dark compartment was calculated for both sessions and analyzed with a two-way ANOVA (AUC per session x

period). Time spent in the dark at baseline gives supplementary information about the anxiety of the animal and the learning effect when the test is repeated the second time.

### Anxiety-like behaviors

Elevated plus maze (EPM) paradigm was used to assess anxiety-like behaviors 4 weeks post-surgery. This test is based on the preference of the animal for dark enclosed areas over bright open ones. The animal was placed in the center of an elevated plus maze to explore freely for 5 minutes. The time spent and the number of entries in the open and closed branches was measured. Greater time spent in the dark and closed branches compared to the bright and open one indicated a more important state of anxiety.

### Evaluation of memory functions

During the 5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> week after surgery, working and spatial memory were evaluated using the novel object recognition test (NORT) and the object location test (OLT) adapted from Ennaceur & Delacour, 1988. For the **habituation phase**, animals were to explore an empty open-field for 10 min/day during 3 days. The next day, for the **familiarization phase**, two identical novel objects that the animal could not move or climb were placed into the corners of the open-field for a 15 minutes exploration phase. For the analysis, only the 5 first minutes of exploration were used. An hour later, for the **test phase**, using the same object configuration, one familiarized object was replaced with a novel object and the animal could explore for 5 min. In the OLT the same phases were reproduced but during the test one of the 2 objects was relocated in another corner of the open-field.

The analysis was based on the discriminative index calculated as follows:

**D1** = “Exploration’s time of object that will move or change” - “Exploration’s time of familiar object that does not move or change”

**D2 = D1** / “Total object exploration’s time”. The closer D2 is to 0, the less preference animals have for an object. If D2 is significantly superior to 0, the preference is for the new or moved object. A one sample t test was performed to compare the discriminative index to 0 for each group.

#### Assessment of social interaction and social memory

The device used to assess social interactions and memory was a rectangular box divided into three chambers, with access to each chamber. The test was divided into three phases:

- The tested rat was first placed in the box and allowed to explore the three chambers freely for 10 minutes (habituation phase).
- After the habituation phase, a young unfamiliar adult rat of the same sex was placed in a wire cage in the left or right chamber (alternating systematically) and an empty wire cage was placed in the chamber on the other side. The subject rat was placed in the middle chamber and allowed to explore the three chambers freely for 10 minutes (**sociability test**).
- To assess novelty preference: at the end of the sociability test, the subject is gently guided to the middle chamber, while the empty wire cage was replaced by a new, unfamiliar, young adult rat of the same sex. The subject rat was again allowed to freely explore the three chambers for 10 minutes to quantify social preference for a new, unfamiliar rat (**social novelty preference test**).

After this test of social novelty, the rats were returned to their original cage.

To assess **social memory**: an hour later, a familiar rat was placed in the left or right chamber, and a new, young-adult, same-sex, unfamiliar rat was placed in the cage in the other chamber. The subject freely explored the three compartments for 10 minutes. The different phases and all tests (sociability, novelty preference, social memory) were filmed and the time spent exploring each compartment was measured. The analysis was based on the discriminative

indexes calculated using the same method as described earlier for NORT test (except that the novelty introduced was another rat instead of an object).

### **Depressive-like behaviors**

At week 8 post-surgery, depressive-like behaviors were assessed using the splash test and the forced swim test. In the splash test, grooming score was measured for five minutes after spraying the back coat of the animal with a 10% sucrose solution. A low grooming time is indicative of neglect, which may be analogous to the lack of care sometimes observed in depressive patients (Santarelli et al., 2003; Yalcin et al., 2008). In the forced-swim test, rats were placed in a Plexiglas cylinder (diameter: 30 cm; wall height: 60 cm), filled with water (height: 40 cm) at room temperature (22 to 24°C) for six minutes. The animal was considered immobile when it floated, and its movements were limited to keeping its head above water. The duration of immobility is an indicator of the intensity of the depressive state and was measured during the 4 last minutes of the test (Yalcin et al., 2008).

### **Statistical analysis**

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) and statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 8.0.2 software (GraphPad Software Inc. California, U.S.A.). The normal distribution of the values was verified using a Shapiro-Wilk or Kolmogorov-Smirnov test. A p value below 0.05 was considered statistically significant. The baseline of mechanical nociception of the MS and CTRL groups were compared using an unpaired Student's test. We used a three-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) to analyze results of the calibrated forceps test and acetone test followed by a Tukey's multiple comparisons *post hoc* test to investigate the effect of the following factors separately and their interactions: neonatal treatment; surgery and time. Two-way ANOVA (group x time) followed by a Tukey's multiple comparisons *post hoc* test was performed to compare groups scores in the acetone test and SADAC results. A one-way ANOVA test was used to compare groups for the following experiments: EPM, Splash test and Forced swim test. One sample t test was performed to analyze the results (0 as theoretical mean) of sociability, social novelty

preference, social memory, NORT and OLT tests. Kruskal-Wallis test or one-way ANOVA were performed to compare the values of the groups for those tests.

## **Results**

### **MS caused a delayed and less intense development of the neuropathy induced nociceptive hypersensitivity**

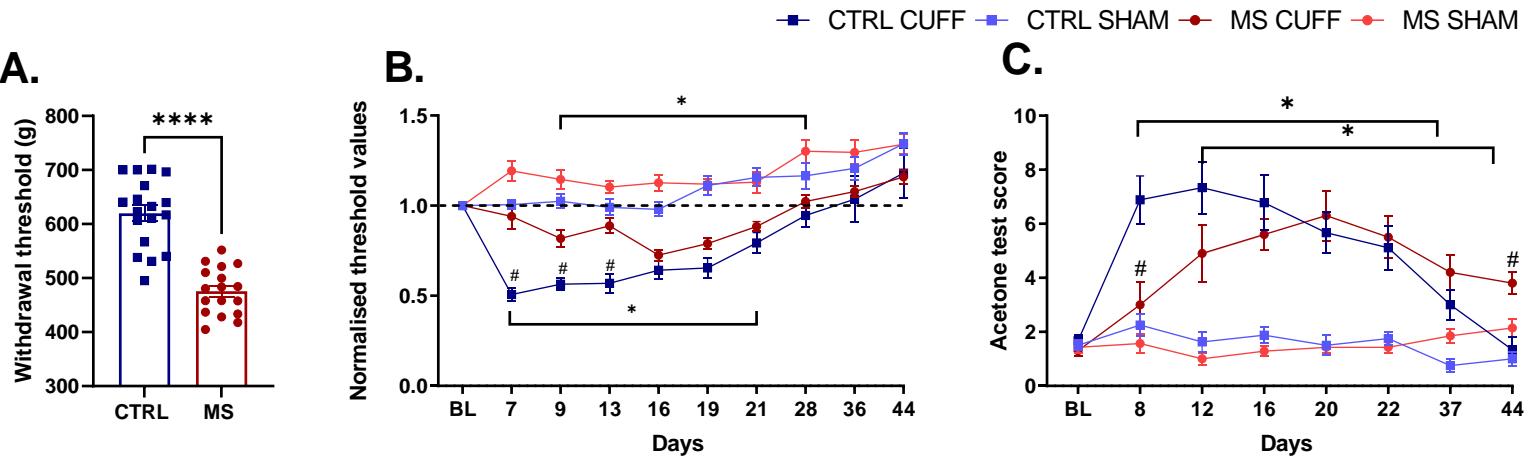
Before surgery, MS and CTRL rats presented significantly different withdrawal thresholds presented in **Figure 1A** (MS:  $475,5 \pm 10,57$  g versus CTRL:  $619,8 \pm 15,05$  g; unpaired Student's test,  $t=7,762$ ,  $p<0,0001$ ) indicating that MS induced a mechanical nociceptive hypersensitivity at baseline. For the evaluation across time after surgery, the data is presented as normalized values; the value of 1 was attributed to the baseline of each animal for mechanical nociception.

Evaluation of mechanical nociception across time after surgery showed a significant effect of time, neonatal treatment and surgery (**Figure 1B**; three factor ANOVA matched by time  $p<0,0001$  for time and surgery,  $p=0,0093$  for neonatal treatment followed by a Tukey's multiple comparisons test) as well as a significant interaction of time x neonatal treatment, time x surgery and time x neonatal treatment x surgery (Three factor ANOVA matched by time  $p<0,0001$  for all of the interactions). The cuff surgery induced a less intense and delayed appearance of symptoms in the MS group. For the CTRL-CUFF group, a week after surgery normalized response decreased by half (from 1 at baseline to  $0,512 \pm 0,037$  at day 7) and were significantly different from the CTRL-SHAM group from day 7 to day 21. After day 21, CTRL-CUFF animals started to slowly recover, their withdrawal values being close to baseline values ( $0,941 \pm 0,069$  on day 28 to  $1,312 \pm 0,058$  on day 44). However, in the MS-CUFF group, withdrawal thresholds decreased very slowly from 1 at baseline to only  $0,725 \pm 0,069$  16 days post-surgery after which values started to increase following the same speed as the CTRL-CUFF group. MS-CUFF values significantly differed from MS-SHAM group for a week only, from day

16 to day 19. The values of MS-CUFF group were significantly higher a week after surgery than CTRL-CUFF group ( $0,941 \pm 0,069$  for MS-CUFF versus  $0,512 \pm 0,037$  for CTRL-CUFF, Tukey's multiple comparisons test,  $p=0.05$ ). We conclude that MS had a major impact on the development of the neuropathy induced mechanical hypersensitivity as it was delayed and less intense compared to the CTRL-CUFF group.

The same evolution of symptoms is seen with the assessment of cold allodynia using the acetone test as illustrated in **Figure 1C**. Statistical analysis showed a significant effect of time and surgery (Three factor ANOVA matched by time  $p<0,0001$  for time and for surgery) however it showed no effect of neonatal treatment but a significant effect of the interaction of time x neonatal treatment and time x neonatal treatment x surgery (Three factor ANOVA matched by time  $p<0,0001$  and  $p=0,0377$  respectfully). Behavioral pain scores of CTRL-CUFF group reached  $6,889 \pm 0,889$  a week after surgery, confirming the development of cold allodynia. A two-way ANOVA analysis (Two-way ANOVA group x time matched by time;  $p<0,0001$  for the factors time and group) followed by Tukeys' *post hoc* test comparing all the groups showed that these scores were significantly higher than CTRL-SHAM group from day 8 to day 37. Scores slowly decreased to basal values of  $1,333 \pm 0,471$  on day 44, showing a complete remission from cold allodynia. Conversely, the scores of the MS-CUFF group had a staggered evolution as their scores reached a peak of  $6,3 \pm 0,932$ , 20 days after the surgery and significantly differed from the MS-SHAM group between day 12 and day 44. On day 8, their scores were significantly lower than CTRL-CUFF group (Tukey's multiple comparisons test  $p=0.05$ ). Scores slowly decreased to  $3,8 \pm 0,416$  on day 44 but did not reach basal values, showing thus that the animals had not fully recovered from cold allodynia.

In conclusion, MS impaired the development of the neuropathy by delaying the evolution of mechanical and thermal hypersensitivities and lessening their intensities in both modalities.



**Figure 1: Effect of MS on basal nociception and the development of the neuropathy.** (A) Mechanical basal nociception in MS (n=17) and CTRL (n=18) groups before surgery. Statistical test: Student's test,  $t=7,762$ , (\*\*\*\*)  $p<0,0001$ . (B) Mechanical nociceptive sensitivity after surgery (CTRL Sham n=8, CTRL Cuff n=10, MS Sham n=7, MS Cuff n=10) and (C) Cold allodynia scores in both groups and surgery condition (CTRL Sham n=8, CTRL Cuff n=9, MS Sham n=7, MS Cuff n=10). Statistical test: Three factor ANOVA matched by time, (\*)  $p<0.05$  for intragroup comparison (cuff vs sham in a same group) and (#)  $p<0.05$  for comparison of cuff conditions between MS and CTRL animals. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

### Neuropathy but not MS impaired learning in the SADAC test

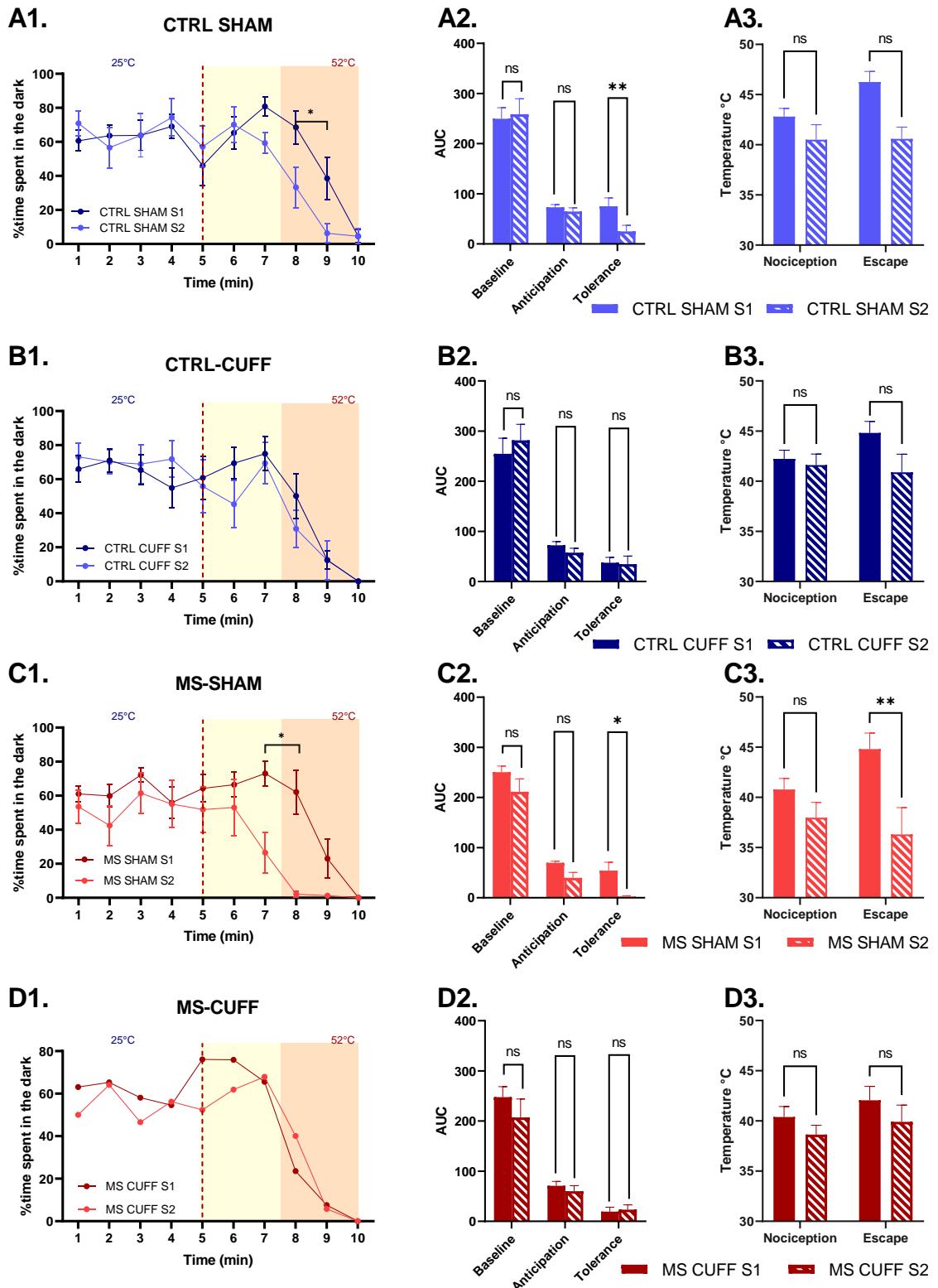
Results of the SADAC test are presented in **Figure 2**, as follows: **(A1-A3)** for CTRL-SHAM, **(B1-B3)** for CTRL-CUFF, **(C1-C3)** for MS-SHAM and **(D1-D3)** for MS-CUFF. The first graphics of each line represent the comparison between sessions of the % of time spent in the dark across time. The second histogram represents the comparison between sessions of the AUC of the time spent in the dark for the baseline period, the anticipation period and the tolerance period. Finally, the last ones illustrate the comparison between sessions for the temperatures of first nociceptive behaviors and definitive escape from the dark compartment.

Regarding the % of time spent in the dark across time (**Figure 2A1; B1; C1 and D1.**) differences between sessions were only significantly different for the CTRL-SHAM and MS-SHAM groups (Two-way ANOVA, matched by session,  $F(9, 70) = 2,780$  and  $p=0.0076$  for the interaction for the CTRL-SHAM and  $F(1, 60) = 17,27$  and  $p=0.0001$  for MS-SHAM for the session factor).

For the different periods of the test (**Figure 2A2; B2; C2 and D2**), there were no differences for all groups in the baseline period. In the anticipation period, there were also no differences between sessions for all groups. Finally, during the tolerance period, only CTRL-SHAM and MS-SHAM groups spent significantly less time in the dark compartment (Two-way ANOVA, matched by period,  $F=5,5$  and  $p=0,0289$  for the CTRL-SHAM and  $F=11,44$  and  $p=0,0148$  for MS-SHAM for the session factor).

Concordantly, the temperature of escape from the dark compartment lowers almost significantly for CTRL-SHAM group, decreasing from  $46,25 \pm 1,06$  to  $40,59 \pm 1,17$  (Two-way ANOVA,  $F=10,10$ ;  $p=0,06$ ) and significantly for MS-SHAM group, with the temperature decreasing from  $44,8 \pm 1,59$  to  $36,3 \pm 2,67$  (Two-way ANOVA,  $F=3,814$  and  $p=0,0152$ ) (**Figure 2A3 and C3, respectively**).

We conclude from the test that the neuropathy, but not the neonatal stress, impaired the conditioning learning as only the sham condition spent significantly less time in the dark during the second session of the baseline period compared to cuff condition of CTRL and MS groups.



**Figure 2: Results of SADAC test.** (A1) is the time spent in the dark across time, (A2) area under the curve (AUC) for the three period of the test and (A3) the temperatures of first nociceptive behaviour and escape, all comparing the first and the second session for the CTRL-SHAM group (n=8), (B1-3) for CTRL-CUFF (n=8), (C1-3) for MS-SHAM (n=7) and (D1-3) for MS-CUFF (n=9). Statistical test: Two way ANOVA (session x time) matched by time, (\*) p<0.05 (\*\*\*) p<0.01 for sessions' comparisons. Data are expressed as means  $\pm$  SEM. S1 = session 1; S2 = session 2 and ns = non-significant.

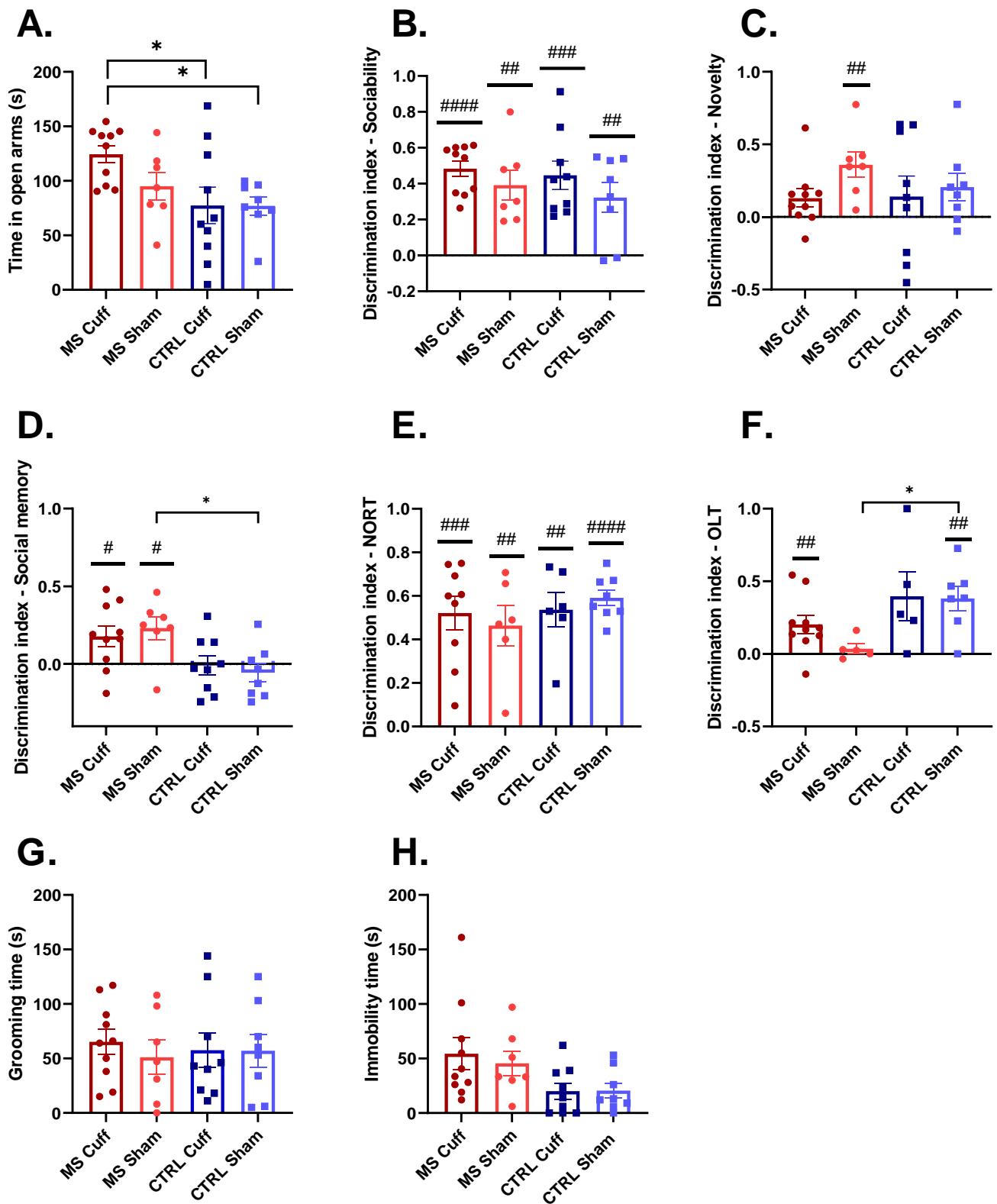
### **MS after neuropathy prevented anxiety-like behaviors**

The EPM test showed that time spent in the open arms significantly differed between groups (**Figure 3A.**; one-way ANOVA,  $F=0,3547$ ;  $p=0,0257$ , followed by Tukey's multiple comparisons test  $p=0,05$ ). CTRL groups spent shorter mean time in the open arms compared to MS-CUFF group ( $77,44 \pm 16,76$ s for CTRL-CUFF and  $77,15 \pm 8,327$ s for CTRL-SHAM versus  $124,5 \pm 8,005$ s for MS-CUFF and  $95,00 \pm 12,68$ s for MS-SHAM). In our testing conditions, MS-CUFF group appear to be less anxious than CTRL-CUFF and CTRL-SHAM groups as they spend twice as much time in the open arms of the EPM.

### **Observation of social interactions and social memory**

For the evaluation of sociability after surgery, we report no impairment after the development of the neuropathy as all animals from all groups had discriminative indexes statistically different from 0, meaning, they spent significantly more time with a stranger animal than with an object during the test (**Figure 3B.**; one sample t test;  $t=11,21$  and  $p<0,0001$  for MS-CUFF ;  $t= 4,755$  et  $p=0,0031$  for MS-SHAM ;  $t=5,660$  and  $p=0,0005$  for CTRL-CUFF ;  $t=3,863$  and  $p=0,0062$  for CTRL-SHAM).

Results of the preference for novelty test are presented in **Figure 3C**. CTRL-SHAM group had a discriminative index of  $0,2062 \pm 0,0951$  (meaning animal had a preference for the new rat) but statistical analysis revealed that the difference from 0 was not significant (One sample t test;  $t=2,167$  and  $p=0,0669$ ). In the CTRL-CUFF group, some rats spent more time with the known rat than with the new one (index lower than 0), the mean discriminative index being  $0,1403 \pm 0,1409$  and not significantly different from 0 after statistical testing (One sample t test;  $t=0,9958$  and  $p=0,3485$  for CTRL-CUFF). For the MS condition, only MS-SHAM group demonstrated a clear preference towards novelty with a discriminative index of  $0,3597 \pm 0,0854$  compared to the index of MS-CUFF of  $0,1299 \pm 0,0631$  (One sample t test;  $t=2,057$  and  $p=0,0698$  for MS-CUFF;  $t= 4,211$  et  $p=0,005$  for MS-SHAM). However, a comparison of all groups revealed no significant differences between them (One-way ANOVA,  $F= 0,9984$ ,  $p=0,4071$ ).



**Figure 3: Assessments of emotional and cognitive impairments following neuropathy in CTRL and MS groups.**

Animals underwent the test of (A) Elevated plus maze (EPM), (B) sociability, (C) preference for social novelty, (D) social memory (E) novel object recognition (NORT), (F) object location task (OLT), (G) splash test and (H) forced swim test. CTRL Sham n=8, CTRL Cuff n=10, MS Sham n=7, MS Cuff n=10. Statistical test: One-way ANOVA test was used to compare groups for the EPM, splash test and forced swim test. One sample t test with 0 as theoretical mean was performed to analyze the results of sociability, social novelty preference, social memory, NORT and OLT tests and illustrated as follows: (#) p<0.05, (##) p < 0.01, (###) p < 0.001 or (#####) p < 0.0001. One-way ANOVA was performed to compare the values of the groups for those tests except for OLT for which Kruskal-Wallis test was used. (\*) p<0.05 for intergroup comparison. Data are expressed as means  $\pm$  SEM.

Regarding social memory illustrated in **Figure 3D.**, CTRL groups of both surgery conditions preferred spending time with a known rat than with a new one (One sample t test;  $t=0,1410$  and  $p=0,8913$  for CTRL-CUFF ;  $t=0,9380$  and  $p=0,3795$  for CTRL-SHAM). On the contrary, MS animals of both groups, when presented to a previously encountered rat and a new stranger rat, spent significantly more time exploring the new rat which interprets as a functional social memory (One sample t test;  $t=2,704$  and  $p=0,0242$  for MS-CUFF ;  $t= 3,165$  et  $p=0,0194$  for MS-SHAM).

### **MS impaired spatial but not working memory**

No impairment of working memory tested with NORT was observed as discriminative indexes for all groups were significantly different from 0 (**Figure 3E.**; One sample t test;  $t=6,846$  and  $p=0,0001$  for MS-CUFF ;  $t= 4,955$  et  $p=0,0043$  for MS-SHAM ;  $t=6,803$  and  $p=0,001$  for CTRL-CUFF ;  $t=16,65$  and  $p<0,0001$  for CTRL-SHAM).

On the other hand, in the evaluation of spatial memory with OLT (**Figure 3F.**), MS-SHAM group is the only group presenting a discriminative index not statistically different from 0 ( $0,03612 \pm 0,0744$ ; one sample t test;  $t=1,086$ ,  $df=4$  and  $p=0,3387$ ) and significantly different from CTRL-SHAM's ( $0,3813 \pm 0,08544$ ) (Kruskal-Wallis;  $KW= 8,429$ ;  $p=0,0379$ ). It can be said that neuropathy did not majorly alter spatial memory in CTRL-CUFF group as its value was close to the value of the CTRL-SHAM and the p value of the T test is of  $0,0789$ , close to being significant (One sample t test;  $t=2,346$  and  $p=0,0789$ ). Statistical analysis also showed that MS-CUFF group succeeded in the test (One sample t test;  $t=3,274$  and  $p=0,0096$ ).

### **Depressive-like behaviors were not observed after MS nor neuropathy**

No differences between groups were observed regarding the splash test (**Figure 3G.**; one-way ANOVA  $F=2,670$ ;  $p=0,0654$ ) nor the forced swim test (**Figure 3H.**; one-way ANOVA,  $F=0,1678$ ;  $p=0,9173$ ), both evaluating depressive-like behaviors.

## **Discussion**

The aim of this study was to examine the impact of MS on the development of cuff-induced neuropathy and its associated behavioral comorbidities. Contrary to our working hypothesis that MS would increase the symptoms of neuropathic pain, we saw that MS animals presented a markedly delayed and less intense development of mechanical hypersensitivity and cold allodynia following cuff surgery. However, when symptoms faded after 40 days in CTRL animals, MS animals did not totally recover from cold allodynia at the end of the experiment.

Our first conclusion is that MS induced a resilience against neuropathic pain and delayed its development instead of being an aggravating factor. Here, we refer to resilience as the ability of an individual to respond adaptively to acute stressors in a positive manner. Opposed to these results, a study on a mice model of MS (3h/day, P1-P21) demonstrated that MS induced anxiety- and depressive-like behaviors and aggravated symptoms in a chronic constriction injury (CCI) model of neuropathy (Mizoguchi et al., 2019; Nishinaka et al., 2015). Another model of MS (6h/day, P15-P21) followed by social isolation also induced an enhancement of nociceptive hypersensitivity following the establishment of neuropathy in a spared nerve injury model (Nishinaka et al., 2015). Given the nociceptive hypersensitivity of the MS group, we expected aggravated nociceptive symptoms after the cuff surgery, as was seen with our previous work on an inflammatory pain model using carrageenan injections (Melchior et al., 2018). However, a recent study of Genty et al. showed similar results to ours using the same rat model of MS and the CCI model to induce neuropathic pain (Genty et al., 2018). Although basal nociceptive hypersensitivity was not detected in their experimental conditions in the MS group, they still concluded to a resilience against neuropathic pain at adulthood as mechanical hypersensitivity following surgery (Von Frey test) and thermal sensitivity (Cold plate test) were delayed and reduced. This study of a different laboratory using different tests supports the robustness of our results that suggest to a resilient effect of MS in the case of neuropathic pain, thereby reopening the debate around ELS as a risk factor predisposing to chronic pain.

In terms of mechanisms underlying the resilience against neuropathic pain, Genty et al., in the earlier mentioned study, correlated the symptoms with a higher mRNA levels of a neuronal glutamate transporter, EAAT3, in the spinal cord suggesting a reduced spinal transmission of nociceptive information via an increased glutamate re-uptake in the MS group. They also observed a decrease in microglia activation in the MS groups compared to CTRL groups and a reduced expression of interleukins- (IL) 1 $\beta$  and glial fibrillary acidic protein (GFAP) during the earlier phase of the neuropathy, indicating its possible involvement in the development but not in the maintenance of the neuropathy (Genty et al., 2018). As our team also described a sub-inflammatory state in MS animals supported by an increased expression in the spinal cord at basal state of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and Cox-2 it would be interesting to measure their levels after the neuropathy induction to compare with CTRL animals (Gazzo et al., 2021).

Another hypothesis lies in MS altering descending systems modulating pain sensitivity. Our team had previously demonstrated that MS impaired the oxytocinergic analgesic descending pain control, but many others involved in pain modulation can be considered, such as the noradrenergic system (Melchior et al., 2018). MS happens during an important anatomical reorganization of the serotonergic and noradrenergic systems (from P7 to P21 for serotonergic and from P0 to P7 for noradrenergic system) (de Kort et al., 2022; Rajaofetra et al., 1992). Moreover, MS was demonstrated to reduce the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus (DRN) and noradrenergic neurons in the locus coeruleus, provoking an imbalance resulting in the hypersensitivity to pain of the model (Vilela et al., 2021). Persistent alterations were also observed regarding mRNA expression in the MS model with an increased expression of 5-HT1A receptor in the amygdala but a reduced one, as well a reduced expression of serotonin transporter, in the DRN (Bravo et al., 2014). A previous work of our team in a mice model of cuff surgery demonstrated using mass spectrometry that serotonin concentrations in the brainstem of cuff animals drastically decreased 2 weeks after surgery and up to 8 weeks but were restored with an etifoxine treatment (Kamoun et al., 2021). In parallel, there are interestingly emerging evidences arguing that noradrenergic neurons of the locus coeruleus and their terminals in the dorsal reticular nucleus, among other projections, facilitate pain and participate in the development and maintenance of hyperalgesia as their

activity is enhanced after nerve injury in the descending pain facilitation pathway (Martins et al., 2015; Taylor & Westlund, 2017). Based on these evidence demonstrating that noradrenergic neurons of the locus coeruleus facilitate pain after nerve injury, but these same neurons activity is diminished by MS, we can hypothesize that MS induced changes in the inhibition/excitatory balance of descending pain controls, delaying thus the development of hypersensitivity and decreasing its intensity after nerve injury.

Regarding epigenetic changes, our team have previously described lasting and significant changes in the expression of epigenetic factors inducing chromatin compaction. For instance, we identified a durable overexpression of coding RNA for HDAC1, -5, -7, -8, and 11, as well as of the non-coding micro-RNA (miR) 7a, and an under expression of miR21 and 29 in MS rats (Illouz et al., 2023; Melchior et al., 2018). MiR-7a, mainly expressed in small neurons, considered as nociceptive neurons, is a key RNA for nociception since downregulation of miR-7a is causally involved in the maintenance neuropathic pain via a regulation of neuronal excitability in rats (Sakai et al., 2013; Sakai & Suzuki, 2015). However, miR-7a is overexpressed in our model from postnatal day 7 to 45, providing thus a possible resilience against the neuropathy. Another investigated miR is mir21, which is underexpressed from P7 to P100 in MS animals, could also have a neuroprotective role, as it has been previously suggested in the literature (Mao & Ding, 2019).

To further investigate which mechanisms are on display regarding this resilience against neuropathic pain, our team is currently performing a reverse transcription qPCR analysis on the brain, spinal cord as well as the sciatic nerve targeting the expression of multiple biological markers. First, changes in the expression of pro- and anti-inflammatory cytokines such as TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6, and IL-10 need to be assessed as our team have previously demonstrated changes in their expression following MS (Gazzo et al., 2021). Moreover, the expression of GFAP and CD11b across conditions will be quantified to investigate the potential participation of astrocytes and microglia in mediating MS resilience to neuropathic pain. As GABAergic inhibition is crucial for the regulation of nociceptive information, anxiety or social anxiety, we also want to investigate the expression of the chloride transporters NKCC1 and KCC2. Finally, considering the importance of descending noradrenergic controls in modulating pain we aim

to unveil eventual differences in ADRB2 Adrenoceptor Beta 2 and ADRA2A Adrenoceptor Alpha 2 A gene expression. This analysis will be performed to compare the two very different time points, day 7-post surgery where symptoms are weak in the MS group and intense in the CTRL group and day 16 where it peaks for the MS group.

In the second part of the study, the SADAC showed that the MS- and CTRL-SHAM groups learned to leave the dark compartment earlier during session 2 compared to the MS- and CTRL-CUFF groups, for which the conditioning learning is absent. We conclude that neuropathy blunted conditioning learning in both CTRL and MS animals, which our team already described when validating the SADAC test (Gieré et al., 2022). We saw no differences between MS-SHAM and CTRL-SHAM group regarding anxiety- and depressive-like behaviors, which is surprising as MS was first described as a model of anxiety and depression. There was no effect of the neuropathy alone as SHAM and CUFF conditions in both groups spent similar mean times in the open arms of the EPM and were not different regarding depressive-like behaviors. However, a difference was found regarding MS-CUFF group that spent more time in the open arms compared to CTRL groups, presenting thus a less anxious behavior. This can be interpreted in two different ways, either our CTRL groups are showing anxiety-like behavior because of the experiment, or the neuropathy after MS induced a resilience to it. To discuss these hypotheses, there is need to redo the experiment to confirm or not that CTRL groups are showing anxiety-like behaviors.

As for the effect of the neuropathy, the Sprague-Dawley strain is known to be quite resistant to comorbidities associated with neuropathic pain in many models (Hestehave et al., 2020; Hubbard et al., 2015; Okun et al., 2016) which is consistent with the effect of the neuropathy alone as SHAM and CUFF condition did not differ in anxiety-like behavior. However, many divergences or differences for anxiety behaviors can be found in the literature mostly depending on the neuropathic pain model, the strain and timing of the test (Fonseca-Rodrigues et al., 2021; Hestehave et al., 2020). Indeed, Hestehave and colleagues' systematic review of the cognitive and emotional consequences of chronic constriction injury revealed variations in the onset of anxiety-like behavior depending on strains and studies (Hestehave et al., 2020). Sprague-Dawley rats have been reported to exhibit anxiety-like behavior as early as

one-week post-surgery, while Wistar rats typically showed similar behaviors starting in the third week post-surgery, as assessed by EPM. In contrast, another study found no evidence of anxiety-like behaviors in Sprague Dawley rats using the elevated zero-maze (Fonseca-Rodrigues et al., 2021). These studies, as well as our own, highlight the limitations of using animal models of neuropathic pain to study the affective and cognitive comorbidities of chronic pain, which are observed in clinical studies.

No differences on sociability were observed, but for the social novelty preference test, the CTRL-SHAM group surprisingly did not prefer novelty as opposed to MS-SHAM group. CUFF condition of both groups also preferred familiarity to novelty. During the social memory test, CTRL-SHAM animals remained again with the familiar rat instead of the new one, as opposed to MS-SHAM animals. Regarding CUFF animals, CTRL-CUFFs also stayed with the familiar rat as opposed to MS-CUFFs. Few studies evaluate social cognitive functions in neuropathic pain models; however, a study on a rat model of CCI has also revealed an impairment of social recognition memory (Grégoire et al., 2012). We cannot conclude on this matter as both surgery conditions had similar results in our CTRL groups. This demonstrates the importance of “background anxiety” levels of animals that could be due to experimental conditions such as housing conditions, habituation, or even illumination during tests.(File & Hyde, 1978; Rex et al., 2004). We can also speculate that emotional contagion is a possible explanation for the behaviors of CTRL but not MS groups, as animals are housed in groups of four (two SHAMs and two CUFFs), and it was demonstrated that housing neuropathic animals induced anxiogenic-like effects in the non-neuropathic cage mates (Baptista-de-Souza et al., 2015). It is therefore a necessity to redo the tests and increase the number of animals, as interindividual differences are more important in those tests to conclude on the effect of neuropathy.

Memory function testing revealed that working memory was functional but not spatial memory in MS-SHAM group. This deficit in spatial memory is very clear in the MS-SHAM group but absent in the MS-CUFF. Our team is currently working on this subject, as we found that MS induced lasting impairment of spatial memory linked to neuroinflammation in the hippocampus (paper in preparation). Based on these results we can speculate that MS after neuropathy preserved this impairment of spatial memory.

Taken together, it seems that adaptability remains possible despite the neonatal stress, as (social novelty preference test aside) no major impact of MS followed by the cuff surgery was observed across tests, it even seems to the contrary that this group is the least impacted. Several reviews and meta-analyses on the subject of ELS models demonstrated that they presented considerable variability in behavioral results and phenotype (Macrì et al., 2011; Murthy & Gould, 2018). They range from vulnerability to resilience, to no effect at all, mostly depending on the severity of the neonatal stress and its timing, the species, the strain but also individual variability. Our results suggest a positive adaptation in MS animals against neuropathic pain.

In conclusion, this study highlighted that neonatal stress has many diverse effects at adulthood, including vulnerability and deficits for basal nociception and spatial memory, but also adaptability and resilience in the specific case of neuropathy, on both nociceptive symptoms and cognitive functions. It also raised many interrogations regarding the mechanisms involved in this MS-induced resilience for the nociceptive symptoms, and so, further studies are required to investigate them.

## References:

- Antoniou, G., Lambourg, E., Steele, J. D., & Colvin, L. A. (2023). The effect of adverse childhood experiences on chronic pain and major depression in adulthood : A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Anaesthesia*, 130(6), 729-746. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2023.03.008>
- Aouad, M., Petit-Demoulière, N., Goumon, Y., & Poisbeau, P. (2014). Etifoxine stimulates allopregnanolone synthesis in the spinal cord to produce analgesia in experimental mononeuropathy. *European Journal of Pain*, 18(2), 258-268. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00367.x>
- Baptista-de-Souza, D., Nunciato, A. C., Pereira, B. C., Fachinni, G., Zaniboni, C. R., & Canto-de-Souza, A. (2015). Mice undergoing neuropathic pain induce anxiogenic-like effects and hypernociception in cagemates. *Behavioural Pharmacology*, 26(7), 664-672. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000170>
- Benbouzid, M., Pallage, V., Rajalu, M., Waltisperger, E., Doridot, S., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M. J., & Barrot, M. (2008). Sciatic nerve cuffing in mice : A model of sustained neuropathic pain. *European Journal of Pain*, 12(5), 591-599. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2007.10.002>
- Bravo, J. A., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014). Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 24. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00024>
- Burke, N. N., Finn, D. P., McGuire, B. E., & Roche, M. (2017). Psychological stress in early life as a predisposing factor for the development of chronic pain : Clinical and preclinical evidence and neurobiological mechanisms. *Journal of Neuroscience Research*, 95(6), 1257-1270. <https://doi.org/10.1002/jnr.23802>
- Bushnell, M. C., Čeko, M., & Low, L. A. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(7), 502-511. <https://doi.org/10.1038/nrn3516>
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17002. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>
- Coutinho, S. V., Plotsky, P. M., Sablad, M., Miller, J. C., Zhou, H., Bayati, A. I., McRoberts, J. A., & Mayer, E. A. (2002). Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282(2), G307-16. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00240.2001>
- Davis, D. A., Luecken, L. J., & Zautra, A. J. (2005). Are Reports of Childhood Abuse Related to the Experience of Chronic Pain in Adulthood? : A Meta-analytic Review of the Literature. *The Clinical Journal of Pain*, 21(5), 398-405. <https://doi.org/10.1097/01.ajp.0000149795.08746.31>
- de Kort, A. R., Joosten, E. A. J., Patijn, J., Tibboel, D., & van den Hoogen, N. J. (2022). The development of descending serotonergic modulation of the spinal nociceptive network : A life span perspective. *Pediatric Research*, 91(6), 1361-1369. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01638-9>

- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1 : Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47-59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)
- Fagundes, C. P., Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2013). Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. *Brain, Behavior, and Immunity*, 27, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.014>
- File, S. E., & Hyde, J. R. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *British Journal of Pharmacology*, 62(1), 19-24.
- Fitzgerald, M. (2005). The development of nociceptive circuits. *Nat Rev Neurosci*, 6(7), 507-520. <https://doi.org/10.1038/nrn1701>
- Fonseca-Rodrigues, D., Amorim, D., Almeida, A., & Pinto-Ribeiro, F. (2021). Emotional and cognitive impairments in the peripheral nerve chronic constriction injury model (CCI) of neuropathic pain : A systematic review. *Behav Brain Res*, 399, 113008. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113008>
- Gazzo, G., Melchior, M., Caussaint, A., Gieré, C., Lelièvre, V., & Poisbeau, P. (2021). Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 92, 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.010>
- Genty, J., Tetsi Nomigni, M., Anton, F., & Hanesch, U. (2018). Maternal separation stress leads to resilience against neuropathic pain in adulthood. *Neurobiology of Stress*, 8, 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.11.002>
- Gieré, C., Thevenot, A., Menger, Y., Gazzo, G., & Poisbeau, P. (2022). Between Scylla and Charybdis : Assessing the multidimensional aspects of pain behaviors in rats using a double avoidance place preference paradigm. *PAIN*, 10.1097/j.pain.0000000000003383. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000003383>
- Grégoire, S., Michaud, V., Chapuy, E., Eschalier, A., & Ardid, D. (2012). Study of emotional and cognitive impairments in mononeuropathic rats : Effect of duloxetine and gabapentin. *PAIN*®, 153(8), 1657-1663. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.04.023>
- Heim, C., Shugart, M., Craighead, W. E., & Nemeroff, C. B. (2010). Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect. *Developmental Psychobiology*, 52(7), 671-690. <https://doi.org/10.1002/dev.20494>
- Hestehave, S., Abelson, K. S. P., Brønnum Pedersen, T., Finn, D. P., Andersson, D. R., & Munro, G. (2020). The influence of rat strain on the development of neuropathic pain and comorbid anxiodepressive behaviour after nerve injury. *Scientific Reports*, 10(1), 20981. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77640-8>
- Hubbard, C. S., Khan, S. A., Xu, S., Cha, M., Masri, R., & Seminowicz, D. A. (2015). Behavioral, metabolic and functional brain changes in a rat model of chronic neuropathic pain : A longitudinal MRI study. *NeuroImage*, 107, 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.12.024>
- Illouz, H., Melchior, M., Lelièvre, V., & Poisbeau, P. (2023). Pain Hypersensitivity and Analgesia Deficits Induced by Neonatal Maternal Separation in Rats : Epigenetic Mechanisms Identification. *Douleur et analgésie*, 36(4), 264-280. <https://doi.org/10.3166/dea-2022-0277>

- Juif, P. E., Salio, C., Zell, V., Melchior, M., Lacaud, A., Petit-Demouliere, N., Ferrini, F., Darbon, P., Hanesch, U., Anton, F., Merighi, A., Lelievre, V., & Poisbeau, P. (2016). Peripheral and central alterations affecting spinal nociceptive processing and pain at adulthood in rats exposed to neonatal maternal deprivation. *Eur J Neurosci*, 44(3), 1952-1962.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.13294>
- Kamoun, N., Gazzo, G., Goumon, Y., Andry, V., Yalcin, I., & Poisbeau, P. (2021). Long-lasting analgesic and neuroprotective action of the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine in a mouse model of neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 182, 108407.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108407>
- Kikusui, T., Ishio, Y., Nagasawa, M., Mogil, J. S., & Mogi, K. (2016). Early weaning impairs a social contagion of pain-related stretching behavior in mice. *Developmental Psychobiology*, 58(8), 1101-1107. <https://doi.org/10.1002/dev.21443>
- Kontinen, V. K., Kauppila, T., Paananen, S., Pertovaara, A., & Kalso, E. (1999). Behavioural measures of depression and anxiety in rats with spinal nerve ligation-induced neuropathy. *PAIN*, 80(1), 341. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(98\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(98)00230-9)
- Kuhlman, K. R. (2024). Pitfalls and potential : Translating the two-hit model of early life stress from pre-clinical non-human experiments to human samples. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 35, 100711. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2023.100711>
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thrivikraman, K. V., Nemerooff, C. B., & Plotsky, P. M. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biological Psychiatry*, 55(4), 367-375. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.007>
- Luis-Delgado, O. E., Barrot, M., Rodeau, J. L., Schott, G., Benbouzid, M., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M. J., & Lasbennes, F. (2006). Calibrated forceps : A sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain*, 7(1), 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.07.011>
- Macrì, S., Zoratto, F., & Laviola, G. (2011). Early-stress regulates resilience, vulnerability and experimental validity in laboratory rodents through mother–offspring hormonal transfer. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(7), 1534-1543.  
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.014>
- Mao, H., & Ding, L. (2019). Downregulation of miR-21 suppresses 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neuronal damage in MES23.5 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(4), 2467-2474. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7853>
- Martins, I., Carvalho, P., de Vries, M. G., Teixeira-Pinto, A., Wilson, S. P., Westerink, B. H. C., & Tavares, I. (2015). Increased Noradrenergic Neurotransmission to a Pain Facilitatory Area of the Brain Is Implicated in Facilitation of Chronic Pain. *Anesthesiology*, 123(3), 642-653.  
<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000749>
- McEwen, B. S. (2008). Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. *Metabolism*, 57, S11-S15. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.07.006>
- McLaughlin, K. A., Weissman, D., & Bitran, D. (2019). Childhood Adversity and Neural Development : A Systematic Review. *Annu Rev Dev Psychol*, 1, 277-312. <https://doi.org/10.1146/annurev-devpsych-121318-084950>

- Melchior, M., Juif, P. E., Gazzo, G., Petit-Demouliere, N., Chavant, V., Lacaud, A., Goumon, Y., Charlet, A., Lelievre, V., & Poisbeau, P. (2018). Pharmacological rescue of nociceptive hypersensitivity and oxytocin analgesia impairment in a rat model of neonatal maternal separation. *Pain*, 159(12), 2630-2640. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001375>
- Melchior, M., Kuhn, P., & Poisbeau, P. (2021). The burden of early life stress on the nociceptive system development and pain responses. *Eur J Neurosci*. <https://doi.org/10.1111/ejn.15153>
- Miller, G. E., Chen, E., & Parker, K. J. (2011). Psychological stress in childhood and susceptibility to the chronic diseases of aging : Moving toward a model of behavioral and biological mechanisms. *Psychological Bulletin*, 137(6), 959-997. <https://doi.org/10.1037/a0024768>
- Mizoguchi, H., Fukumoto, K., Sakamoto, G., Jin, S., Toyama, A., Wang, T., Suzumura, A., & Sato, J. (2019). Maternal separation as a risk factor for aggravation of neuropathic pain in later life in mice. *Behavioural Brain Research*, 359, 942-949. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.015>
- Mosconi, T., & Kruger, L. (1996). Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy : Ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain*, 64(1), 37-57. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00077-1)
- Moster, D., Lie, R. T., & Markestad, T. (2008). Long-term medical and social consequences of preterm birth. *The New England Journal of Medicine*, 359(3), 262-273. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706475>
- Murthy, S., & Gould, E. (2018). Early Life Stress in Rodents : Animal Models of Illness or Resilience? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00157>
- Nishinaka, T., Nakamoto, K., & Tokuyama, S. (2015). Enhancement of nerve-injury-induced thermal and mechanical hypersensitivity in adult male and female mice following early life stress. *Life Sciences*, 121, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.012>
- Okun, A., McKinzie, D. L., Witkin, J. M., Remeniuk, B., Husein, O., Gleason, S. D., Oyarzo, J., Navratilova, E., McElroy, B., Cowen, S., Kennedy, J. D., & Porreca, F. (2016). Hedonic and motivational responses to food reward are unchanged in rats with neuropathic pain. *PAIN*, 157(12), 2731. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000695>
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 18(3), 195-200. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(93\)90189-v](https://doi.org/10.1016/0169-328x(93)90189-v)
- Rajaofetra, N., Poulat, P., Marlier, L., Geffard, M., & Privat, A. (1992). Pre- and postnatal development of noradrenergic projections to the rat spinal cord : An immunocytochemical study. *Developmental Brain Research*, 67(2), 237-246. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(92\)90224-K](https://doi.org/10.1016/0165-3806(92)90224-K)
- Rex, A., Voigt, J.-P., Gustedt, C., Beckett, S., & Fink, H. (2004). Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology*, 177(1-2), 23-34. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1914-7>
- Ross, C. A. (2005). Childhood Sexual Abuse and Psychosomatic Symptoms in Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Child Sexual Abuse*, 14(1), 27-38. [https://doi.org/10.1300/J070v14n01\\_02](https://doi.org/10.1300/J070v14n01_02)

- Sakai, A., Saitow, F., Miyake, N., Miyake, K., Shimada, T., & Suzuki, H. (2013). miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain*, 136(9), 2738-2750. <https://doi.org/10.1093/brain/awt191>
- Sakai, A., & Suzuki, H. (2015). microRNA and Pain. In G. Santulli (Ed.), *microRNA: Medical Evidence : From Molecular Biology to Clinical Practice* (p. 17-39). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2_3)
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., & Hen, R. (2003). Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science*, 301(5634), 805-809. <https://doi.org/10.1126/science.1083328>
- Taylor, B. K., & Westlund, K. N. (2017). The noradrenergic locus coeruleus as a chronic pain generator. *Journal of Neuroscience Research*, 95(6), 1336-1346. <https://doi.org/10.1002/jnr.23956>
- Tietjen, G. E., Buse, D. C., & Collins, S. A. (2016). Childhood Maltreatment in the Migraine Patient. *Current Treatment Options in Neurology*, 18(7), 31. <https://doi.org/10.1007/s11940-016-0415-4>
- Vilela, F. C., Vieira, J. S., Vitor-Vieira, F., Kalil-Cutti, B., da Silva, J. R. T., Giusti-Paiva, A., & da Silva, M. L. (2021). Maternal separation increases pain sensitivity by reducing the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and noradrenergic neurons in locus coeruleus. *Neurosci Lett*, 748, 135734. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135734>
- Yalcin, I., Bohren, Y., Waltisperger, E., Sage-Ciocca, D., Yin, J. C., Freund-Mercier, M.-J., & Barrot, M. (2011). A Time-Dependent History of Mood Disorders in a Murine Model of Neuropathic Pain. *Biological Psychiatry*, 70(10), 946-953. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.017>
- Yalcin, I., Coubard, S., Bodard, S., Chalon, S., & Belzung, C. (2008). Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. *Psychopharmacology*, 200(4), 497-507. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1227-3>
- Yoon, C., Wook, Y. Y., Sik, N. H., Ho, K. S., & Mo, C. J. (1994). Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 59(3), 369-376. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90023-X)



# Discussion

## IV. Discussion

Dans cette thèse, les conséquences de l'adversité précoce ont été évaluées par le biais de 3 études utilisant un modèle de séparation maternelle chez le rongeur. Ce modèle, s'il possède plusieurs avantages certains notamment au niveau du parallèle neurodéveloppemental avec l'Homme, a aussi, comme ont pu le montrer certains résultats de cette thèse, des limites quant à la transposition des conséquences des adversités précoces observées. Les résultats obtenus avec ce modèle apportent tout de même des réponses concernant les effets d'un stress précoce sur le système nerveux à court et long terme dans des conditions contrôlées, et sur les mécanismes potentiels qui sous-tendent ces modifications. Même si notre évaluation s'est restreinte à l'observation du comportement des animaux, elle apporte des pistes pour expliquer le passage de la vulnérabilité à la pathologie chez l'Homme et confirme l'impact important des stress ayant lieu lors d'une période de forte plasticité cérébrale.

Rappelons d'abord l'objectif de cette thèse qui était d'évaluer à la fois à court et long terme les conséquences comportementales et émotionnelles de la SMN, en nous centrant sur la douleur étant donné son rôle prépondérant dans la survie de l'individu.

La première étude concernant le neurodéveloppement a permis de mettre en évidence un effet de la SMN dépendant de la souche sur l'apparition et la vitesse d'acquisition des réflexes, avec une acquisition précoce des réflexes de retournement de surface et d'évitement de la falaise chez le rat Sprague Dawley (SD) mais pas d'effet ou une tendance au retard chez le rat Wistar. Néanmoins, ces différences induites par la SMN restent transitoires car tous les animaux finissent par acquérir leurs réflexes sans déficit à long terme et avec un écart court (1 ou 2 jours au maximum). Les deux souches différaient sur le développement et les performances pour certains tests. En effet le rat Wistar montrait une acquisition plus précoce pour le test de sursaut tactile, le retournement de surface, la géotaxie négative et l'évitement de la falaise. Nous n'avons pas observé d'effet de la SMN sur les USVs mais une différence de souche car les Wistar vocalisaient plus que les SD. Concernant la nociception, la souche Wistar présentait une plus grande sensibilité à la nociception mécanique que les SD, mais pas

thermique au chaud. Nous avons pu confirmer l'induction d'une hypersensibilité mécanique par la SMN qui débute à P25 chez les deux souches, mais aucunes différences n'ont été observées pour la sensibilité thermique à P9 et P16.

A l'âge adulte nous avons confirmé la persistance de cette hypersensibilité nociceptive chez le rat SD avec lequel les deux autres expérimentations ont été menées. Notre étude évaluant la contagion de la douleur ne démontre pas de modifications des seuils nociceptifs mécaniques ou thermiques au chaud suite à l'interaction d'un rat observateur avec un démonstrateur ayant reçu une injection de CFA (évaluation sur deux semaines) ou de formaline (évaluation sur 3 heures) dans le groupe des animaux contrôle (CTRL) ou SMN. Cependant, l'évaluation des comportements dits de réconfort (allo-toilettages, allo-léchages, mouvement de tête rythmique vers la patte blessée...) de l'AO vers l'AD montre un déficit des comportements prosociaux chez les animaux SMN car une augmentation de ces derniers n'était observable que chez les animaux du groupe CTRL.

Enfin la dernière partie sur le développement de la neuropathie induite par le cuff montre un développement retardé et moins intense des symptômes d'hypersensibilité nociceptive à la suite de la neuropathie chez les rats SMN, contrairement à notre hypothèse initiale. Le résultat principal de cette étude montre ainsi que la SMN a induit de la résilience face à la neuropathie et aux comorbidités associées au lieu d'être un facteur aggravant. Cependant le comportement inattendu des animaux du groupe CTRL lors des tests de comportements ne nous permet pas de tirer plus de conclusions quant à l'effet de la neuropathie, de la SMN ou de l'interaction des deux pour certains tests. En effet, l'évaluation des comportements de type anxi-dépressifs ainsi que des fonctions cognitives (sociabilité, mémoire, apprentissage) a tout de même montré une altération de la mémoire spatiale chez les animaux SMN, qui était absente chez ceux ayant subi la neuropathie.

## 1. Evaluation des conséquences de la SMN à court terme sur le neurodéveloppement et la nociception

Le modèle de SMN que nous utilisons au laboratoire est présenté dans la littérature comme s'apparentant à des maltraitances chez l'Homme (Murthy & Gould, 2018; J. D. White & Kaffman, 2019). La fonction première du stress est de permettre à l'organisme de s'adapter à des changements environnementaux qui perturbent son homéostasie. Ici le stress a lieu durant une période de plasticité cérébrale importante dans un organisme encore en développement et qui plus est, dont le système de l'axe HHS est immature et ses réponses diminuées en comparaison avec celle de l'adulte de P2 à P21 (Sapolsky & Meaney, 1986). La caractérisation que nous avons faite a permis de démontrer des effets du stress néonatal dès les premiers instants de vie. Par la démonstration des décalages dans l'acquisition des réflexes, nous confirmons une altération visible en comportement probablement due à une altération de la maturation des fibres sensorimotrices. La littérature rapporte des changements concernant la myélinisation dans le modèle SMN. Comme les fonctions du tronc cérébral et de la moelle épinière jouent un rôle important dans l'établissement des réflexes sensorimoteurs (Altman & Sudarshan, 1975), il serait intéressant de déterminer les mécanismes moléculaires qui expliquent cette tendance au retard ou cette avance modérée du développement, en se focalisant sur ces régions. Plus précisément, il convient d'évaluer les processus liés aux cellules gliales en particulier en tenant compte des données suggérant une diminution de la myélinisation dans d'autres régions du cerveau à cause de la grande plasticité du système nerveux dans cette période. Une étude avec un modèle SMN (3h/jour de P2 à P21) chez le rat a permis l'observation chez ces animaux d'un déficit en oligodendrocytes matures dû à une réduction des histones désacétylases 1 et 2 activant la voie de signalisation Wnt, ainsi que des altérations importantes de la myélinisation du cPFM. En inhibant la voie Wnt, les expérimentateurs ont pu induire un rétablissement du phénotype pour les comportements de type anxieux, la mémoire de travail et la sociabilité (Yang et al., 2017). Une myélinisation précoce et mal régulée dans le cerveau en lien avec une hausse à P16 des molécules et récepteurs associés à la myéline (BDNF, OMgp et TrkB,) et de l'expression de certains facteurs neurotrophiques dans le cervelet a également été démontré dans autre modèle de SMN

(3h/jour de P10-P15) chez le rat (Miki et al., 2014). Ces différences d'expression se résorbaient à P30. Dans une autre espèce, la souris une SMN similaire à notre modèle (3h/jour P2-P14) a également provoqué une différenciation oligodendrocytaire précoce à P15 et une augmentation de l'expression des gènes liés à la myéline dans le cPFM ce qui a induit à une diminution du pool des cellules progénitrices oligodendrocytaires à l'âge adulte (Teissier et al., 2020). Les conclusions divergentes de ces recherches (hypo ou hypermyélinisation) pourraient être attribuées à la différence de l'époque de l'analyse (P15 chez les souris contre P21 chez les rats), aux différents indicateurs de prolifération utilisés, ainsi qu'aux modèles de séparation différents.

Les modifications potentielles du comportement maternel dans ce modèle jouent également un rôle majeur dans le phénotype à l'âge adulte. En effet, il existe des différences de comportements maternels chez les rongeurs avec des mères plus ou moins maternante (high and low grooming mothers) ce qui influence le phénotype anxieux à l'âge adulte, avec les rats issus de mère peu maternantes montrant des comportements de type anxieux plus important que ceux issus des mères très maternantes (Champagne et al., 2007; Champagne & Meaney, 2007). Il a déjà été proposé que la SMN induirait une augmentation du comportement maternel à la fin de la séparation qui pourrait « gommer » le phénotype qui serait une des explications aux divergences trouvées dans la littérature concernant les conséquences du modèle (Murthy & Gould, 2018). Une étude s'intéressant aux effets d'une SMN (3h/jour de P0-P13) et de handling (séparation courte de 15min de P0-P13) dans 8 souches de souris différentes démontre que le comportement maternel était augmenté dans le groupe SMN et qu'à l'âge adulte il n'y avait pas d'altérations dans tous les groupes testés des comportements de type anxi-dépressif testé dans le labyrinthe en croix surélevé, l'openfield et le test de nage forcée (Millstein & Holmes, 2007). Afin de vérifier cette variable, la mesure du comportement maternel est actuellement en cours sur les nouvelles portées générées au laboratoire. Pour ce faire, la latence à refaire le nid, regrouper les petits et les durées de léchage et de soins aux petits sont mesurées dans les deux groupes (avant et après réunion des ratons et de la mère pour le groupe SMN et aux mêmes heures pour le groupe CTRL).

Une perspective qui pourrait étoffer notre présente étude serait un dosage soit de la libération dans le plasma des corticoïdes, à l'aide de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) ou de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes chez les rats SD et Wistar, par western blot ou par PCR quantitative après transcription inverse (RT-qPCR). En effet les glucocorticoïdes sont connus pour accélérer le développement et sont administrés aux femmes enceintes présentant un risque de naissance prématurée afin de faciliter la maturation des poumons du fœtus (Crane et al., 2003). Des différences entre souches ont pu être observées concernant l'axe HHS par exemple entre le rat Lewis et le Wistar avec une diminution de la réactivité neuroendocrinienne au stress chez le rat Lewis (Oitzl et al., 1995). Cette manipulation permettrait de déterminer si les différences dans le développement proviennent des différences intrinsèques à la souche ou de la variabilité inter-portée liée au comportement maternel. A noter que ces variabilités intra- et inter-portée et de souche, rappellent les différences importantes interindividuelles chez l'Homme qui nécessitent d'augmenter grandement l'effectif des études.

Concernant la nociception, des travaux de notre équipe ont permis de mettre en évidence plusieurs altérations du système nociceptif à l'âge adulte, nous confirmons avec nos résultats que cette hypersensibilité s'installe à P25 pour la modalité mécanique. Cependant, elle n'est pas encore visible avant P25, en tout cas avec les outils de mesure que nous avons utilisés, initialement développés chez l'adulte et adaptés pour une utilisation chez le rat. Avant cette date, comme évoqué dans le Chapitre 1 de l'introduction, a lieu une période importante de réorganisation des fibres de type A et C, les fibres C n'étant fonctionnelle qu'à partir de P10, ainsi que des contrôles descendants inhibiteurs. Une étude précédente a en effet montré qu'à P14 l'enregistrement des neurones nociceptifs spinaux montre que la neurotransmission liée aux fibres C est déjà observable chez des animaux CTRL, mais pas chez des animaux SMN, suggérant une hypoexcitabilité des fibres C à cet âge. Le wind-up, une forme de plasticité liée spécifiquement à l'activité des fibres C, est également observable uniquement à partir de P24 chez les animaux SMN (Juif et al. 2016). Ce retard de maturation semble néanmoins avoir des effets durables sur la fonctionnalité des fibres C et la sensibilité nociceptive associée.

Chez les SMN, les études précédentes ont effectivement relié ces hypersensibilités à plusieurs mécanismes, par exemple des altérations dans l'expression des facteurs de croissance (NGF et GDNF) impliqués dans la maturation des fibres C , à une hausse de l'expression du canal sodium voltage dépendant Nav1.8 impliqués dans l'excitabilité des nocicepteurs des ganglions rachidiens, ainsi qu'une hausse durable de l'expression de l'importateur de chlorure NKCC1 entraînant une baisse de l'inhibition GABAergique dans la ME (Gazzo et al., 2021; Juif et al., 2016). Une autre étude rapporta qu'une SMN de 3h/jour de P2 à P14 induisait une diminution de l'expression du canal potassium voltage dépendant Kv1.2 des neurones des ganglions rachidiens innervant le colon ce qui a pour effet d'augmenter leur excitabilité, expliquant l'hypersensibilité viscérale du modèle (J.-L. Luo et al., 2011). En parallèle, une altération du système ocytocinergique par la SMN a été observée dans nos précédentes études dans le cas d'un recrutement du contrôles descendants ocytocinergique permettant une analgésie induite par le stress (Melchior et al., 2018). Dans cette étude, les rats SMN, après un stress induit par de la nage forcée, ne présentaient pas d'augmentation de leurs seuils nociceptifs mécaniques contrairement aux rats du groupe CTRL. Toujours à propos des contrôles de la douleur, une SMN (3h/jour de P2 à P14) chez le rat induisait une baisse de sensibilité à l'effet analgésiant de la morphine démontrant une altération des contrôles opioïdergiques (Kalinichev et al., 2001). Ce résultat est soutenu par la démonstration chez la souris d'une baisse des récepteurs opioïdergiques mu, kappa et delta dans des structures telles que l'amygdale, la médulla rostroventrale et la PAG à la suite d'une SMN de 6h/jour de P15 à P21 et d'une isolation sociale de 6h/jour (Nakamoto et al., 2020). Notre laboratoire propose l'hypothèse que la SMN induit un dysfonctionnement de la signalisation de l'ocytocine (qui régit dans la période néonatale l'expression des canaux KCC2 en l'augmentant) ce qui entraîne le déséquilibre dans l'homéostasie du chlorure des neurones GABAergique ainsi que le déficit du contrôle descendant de la douleur participant ainsi à l'hypersensibilité nociceptive (Gazzo et al., 2021).

En plus des effets de la SMN, nous avons observé une différence de seuils nociceptifs mécanique entre les deux souches, qui leur sont donc intrinsèques et qui rappelle encore une fois la variabilité génétique au sein d'une même souche et ou d'une même espèce et de plus confirme l'impact robuste de la SMN sur la nociception. Une étude de la littérature comparant

les deux souches n'avait pas montré de différence au niveau de la sensibilité basale au chaud (test du tail flick), mais des différences au niveau de la sensibilité à la morphine et du développement de la tolérance, suggérant tout de même l'existence de différences au niveau du système nociceptif (Mas et al., 2000).

## 2. Evaluation à l'âge adulte de l'impact de la SMN sur la contagion de la douleur

Poursuivant l'évaluation des conséquences de la SMN au long de la vie, nous nous sommes intéressés à son impact sur une fonction au cœur des relations sociales d'un groupe: l'empathie (Decety et al., 2016). Chez le rat, la fonction se rapprochant le plus de celle de l'empathie chez l'Homme est la contagion émotionnelle (Panksepp & Panksepp, 2013). Nous avons donc évalué l'impact de la SMN sur cette fonction en étudiant le phénomène de contagion de la douleur. Les études de la littérature montrent que la contagion de la douleur induit une hypersensibilité nociceptive d'origine centrale chez l'AO car elle peut se mesurer pour différentes modalités nociceptives (Langford et al., 2006). Dans nos conditions expérimentales nous n'avons pas pu décelé de modifications des seuils nociceptifs thermiques ou mécaniques avec les tests de pince calibrée et test de Plantar dans le groupe CTRL ou SMN. Cet effet est pourtant bien documenté et caractérisé chez la souris dans le cadre d'une interaction avec un AD souffrant de douleurs neuropathiques, d'une injection d'acide acétique ou de CFA, mais aussi d'une hypersensibilité induite par le sevrage d'opiacés ou d'alcool (Baptista-de-Souza et al., 2015; Langford et al., 2006; Smith et al., 2016). De même, chez le rat ce phénomène a été observé en utilisant des modèles de douleur neuropathique comme le « spared nerve injury », l'injection de CFA, de venin d'abeille ou de formaline (C. L. Li et al., 2018; Z. Li et al., 2014; Lu et al., 2018; W.-J. Luo et al., 2020; Nazeri et al., 2019). On peut alors se demander si cette absence d'effet est due aux tests et modèles nociceptifs employés pour la mesure de l'hypersensibilité ou à la nature du stimuli peut être pas assez fort pour induire la contagion qui est un comportement très sensible au stress (Martin et al., 2015). Si le test du Plantar montre beaucoup de variabilité, ce n'est pas le cas de celui de la pince calibrée qui a

été démontré comme ayant une bonne sensibilité et une faible variabilité des données (Barrot, 2012; Juif et al., 2016; Luis-Delgado et al., 2006; Melchior et al., 2018). L'absence d'effet observée chez l'individu démonstrateur ne semble donc pas due aux tests de mesure utilisés. Dans la littérature, les modèles de douleurs choisis sont le plus souvent ceux qui induisent une expression claire et facilement visible des comportements douloureux. Cependant, c'est normalement le cas de la formaline, qui induit spontanément un comportement de protection de la patte injectée, voir même un léchage ou secouement de la patte. (Nazeri et al., 2019; Smith et al., 2016). Nous n'avons malheureusement pas mesuré ces comportements chez les animaux injectés dans notre étude, ce qui aurait constitué un contrôle important pour vérifier qu'ils exprimaient bien ces comportements, en plus des hypersensibilités mécanique et thermique, quant à elles bien visibles. Cette absence de contagion à l'animal observateur peut tout simplement être une absence d'effet chez nos rats sur la nociception, une hypersensibilité durant plusieurs jours est un effet très important et les rats sont des animaux sociaux qui ici se sont peut-être adaptés à la situation.

Nous tirons tout de même une observation importante de cette étude qui est le déficit de comportement de réconfort chez les rats SMN, qui pourrait suggérer une altération des processus empathiques, ou au moins prosociaux, dans ce groupe. La contagion à la douleur a été rapportée dans d'autres modèles différents d'adversité précoce. Par exemple, une étude de Kikusui et collaborateurs a mis en évidence une contagion de la douleur visible par le biais d'une augmentation de l'expression de comportement douloureux, mais observable uniquement lorsque deux animaux familiers recevaient au même moment une injection intrapéritonéale d'acide acétique à 0,9% (Kikusui et al., 2016). Dans leur étude, ils montrent que cette contagion est absente chez des souris ayant été sevrée précocement à P14. Une autre étude, toujours chez la souris mais avec un modèle de stress où les mères sont exposées à des doses importantes de corticostérone (80 µg/mL) via leur eau, démontre aussi un déficit de contagion en réponse à une injection de formaline dans la patte (Laviola et al., 2021). Ces différentes approches suggèrent bien un effet délétère sur la contagion de la douleur par l'adversité précoce. En lien avec notre observation du déficit du comportement de réconfort chez les SMN, d'autres modèles d'adversité précoce ont également mis en évidence des

changements dans les comportements sociaux tels que le jeu social et les interactions sociales, mesurées avec le test des 3 chambres à la suite à une d'une privation maternelle de 24h à P3 chez des rat mais également dans un modèle de SMN de 4h/jour de P1 à P21 (Kentrop et al., 2018; Mejía-Chávez et al., 2021). Les données de la littérature proposent que ces déficits soient liés à une altération du système ocytocinergique impliqué dans de nombreux processus sociaux (Veenema, 2012). Une revue de Veenema propose ainsi, à la lumière de plusieurs études évaluant l'impact de l'adversité précoce, que le déficit dans les comportements sociaux tels que la mémoire sociale, le jeu social ou l'augmentation de l'agressivité est lié à des altérations régions-spécifiques, principalement dans le noya paraventriculaire, le noyau supraoptique et le septum latéral, de l'expression de l'ocytocine et de la vasopressine ainsi que de la liaison à leur récepteurs, ce qui a effectivement été observé dans un modèle de SMN (3j/jour de P1 à P14) chez le rat dans une étude de son équipe (Lukas et al., 2010; Veenema, 2012).

Une perspective intéressante serait de réaliser des doubles marquages immunohistochimiques pour c-Fos (marqueur de l'activité neuronale) et pour les récepteurs ocytocinergiques dans les régions du cerveau impliquées dans la contagion émotionnelle, afin de déterminer si un changement de l'activité neuronale et/ou un déficit de l'expression des récepteurs ocytocinergiques serait à l'origine du déficit comportemental observé chez les rats SMN. Les régions principalement impliquées sont le CCA et ses projections vers le noyau accumbens (démonstration dans l'étude utilisant l'optogénétique de Smith et collaborateurs mentionnée dans le Chapitre 2 de l'introduction) ainsi que l'insula (Smith et al., 2021; Yamagishi et al., 2020). Dans une étude récente de Yamagishi et collaborateurs, une augmentation de l'expression de c-Fos dans les neurones contenant des récepteurs d'ocytocine dans le CCA et l'amygdale a été observée lorsque les rats avaient un comportement d'aide envers un congénère familier, de plus dans cette même étude une inhibition de l'ocytocine dans le CCA a retardé l'apprentissage de ce comportement prosocial (Yamagishi et al., 2020).

La contagion de la douleur induisant une hypersensibilité chez l'animal observateur n'est pas la seule preuve d'empathie chez le rat. Nous avons fait le choix de ce genre de protocole car

ils sont relativement simples à mettre en place, et font un parallèle intéressant avec les protocoles d'empathie utilisés chez l'homme, qui consistent souvent à mettre les participants dans des situations où ils observent d'autres personnes en situations de la douleur (en direct, ou par le biais d'images ou de vidéos). Une autre possibilité aurait été d'utiliser un protocole de co-douleur, où les deux individus sont soumis au modèle de douleur comme dans le protocole de Kikusui , et qui devrait induire une augmentation des symptômes chez les deux individus (Kikusui et al., 2016). Néanmoins, une autre proposition serait d'évaluer l'effet de la SMN sur d'autres comportements plus complexes et actifs comme les comportements d'aides et prosociaux motivés par l'empathie chez le rat. Il existe en effet des tests qui permettent de démontrer les comportements prosociaux des rats envers un congénère en détresse (Ben-Ami Bartal et al., 2011). Par exemple, dans le test décrit par Ben-Ami Bartal, Decety et Mason en 2011, un rat est placé dans une arène avec un compagnon familier qui est emprisonné dans un dispositif de retenue. Après plusieurs séances, le rat libre apprend à ouvrir intentionnellement et rapidement le dispositif de retenue pour libérer son compagnon. Les rats dans cette expérience n'ouvriraient pas les contenants vides ou avec des objets. Ce test qui recrute des fonctions cognitives plus complexes (apprentissage, motivation et contagion émotionnelle) serait intéressant à effectuer pour évaluer l'ampleur des déficits induit par la SMN.

En outre, il serait également intéressant, si les déficits de comportements d'aide se confirment, de vérifier si un sauvetage pharmacologique avec des injection d'ocytocine intrapéritonéale durant la SMN permettrait de sauver le phénotype de ces animaux, comme montré auparavant dans notre équipe pour d'autres comportements (Melchior et al., 2018). Un autre type de sauvetage avec l'administration intra-cérébro-ventriculaire de dose physiologique d'ocytocine ou via des injections intranasales avant le test serait également envisageable. Cela confirmerait l'implication du déficit octocinergique dans les modifications comportementales induites par la SMN. Le dosage de l'ocytocine et de corticoïdes plasmatique à l'aide par exemple de la spectrométrie de masse à la suite d'un tel test pourrait également permettre de vérifier si les rats SMN libèrent moins d'ocytocine pendant l'expérience de contagion émotionnelle ou s'ils présenteraient une réaction de stress exacerbée empêchant les

comportements prosociaux envers le congénère. En effet, dans un modèle de LBN chez le rat (restriction des ressources nécessaires au nid), le stress néonatal a été associé à une modification de la trajectoire de développement des cellules exprimant le récepteur ocytocinergique dont l'expression était augmentée à P15 dans le noyau paraventriculaire, l'hippocampe et l'amygdale centrale mais réduites uniquement chez les mâles et augmentées chez les femelles à l'âge adulte dans l'amygdale centrale (Lapp et al., 2020). Chez l'humain, une diminution des concentrations de l'ocytocine dans le liquide cérébrospinal obtenu par une ponction lombaire a été observée chez des personnes reportant des maltraitances et traumatismes dans l'enfance (Heim et al., 2009).

### 3. Impact de la SMN sur le développement d'une neuropathie

Dans la dernière étude, nous nous sommes également intéressés au cas particulier de la douleur neuropathique. Comme nous l'avions introduit dans le chapitre 3, les douleurs chroniques sont associées à des comorbidités importantes et l'adversité précoce chez l'Homme a été démontré comme étant un facteur de risque au développement des douleurs chroniques. Notre étude, contrairement à notre hypothèse initiale, a démontré que la SMN n'était pas un facteur aggravant du développement de la neuropathie mais au contraire qu'elle induisait un retard dans l'apparition des symptômes d'hypersensibilité qui sont en plus moins intenses dans le temps. Les conclusions à partir de l'évaluation des comportements et des fonctions cognitives a été difficile à cause d'un comportement inattendu chez nos rats du groupe CTRL. L'évaluation de ces tests fait actuellement l'objet d'une seconde expérience dans notre laboratoire afin d'augmenter l'effectif du groupe CTRL et de conclure sur l'effet de la neuropathie ou de la SMN.

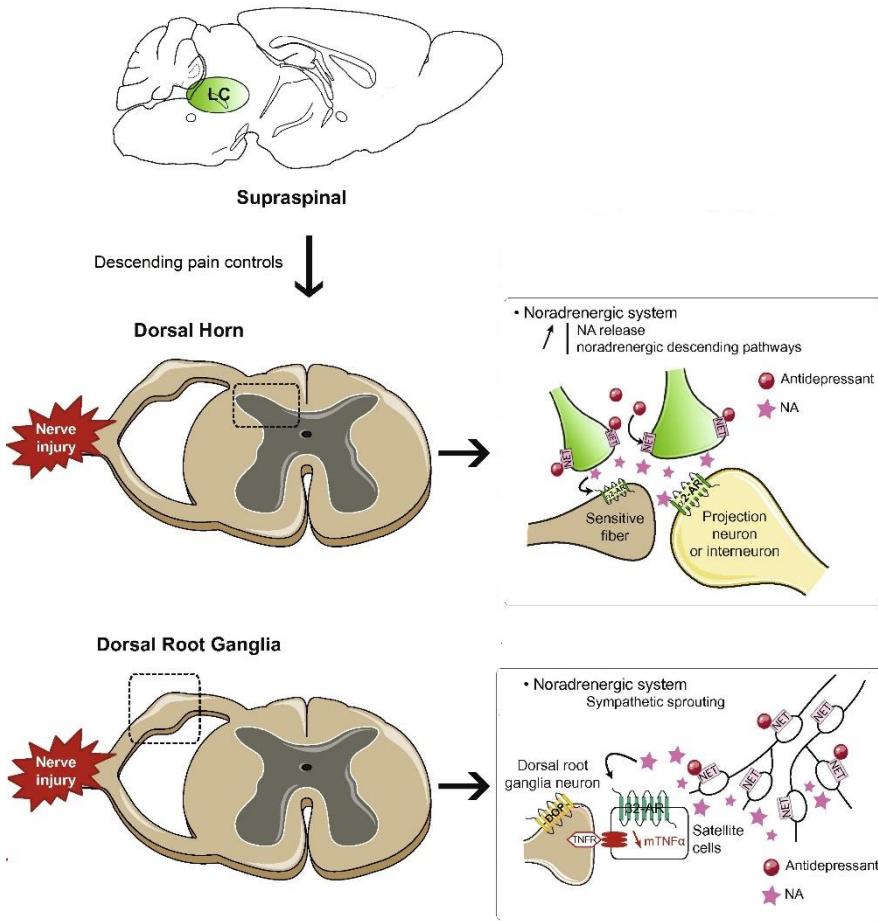
Les données sur l'anxiété et les fonctions cognitives mises à part, un résultat surprenant de cette expérience reste le décalage temporel et la diminution de l'impact de la neuropathie chez les SMN. Les données de la littérature, notamment chez la souris, montrent au contraire le plus souvent une aggravation des symptômes de la neuropathie chez les animaux ayant subis un stress néonatal (Mizoguchi et al., 2019; Nishinaka et al., 2015). Une neuropathie

induite par CCI dans un modèle de SMN chez la souris (3h/jour de P1 à P21) a pour conséquence une aggravation de l'allodynie mécanique mesurée en Von Frey et de l'hypersensibilité thermique au froid mesuré avec un test à l'acétone (Mizoguchi et al., 2019). Une autre étude avec une SMN (6 h/jour de P15 à P21) suivie d'un isolement social (animaux logés individuellement jusqu'à la fin de l'étude) montrait une aggravation de l'hypersensibilité mécanique, testée en Von Frey, et thermique au chaud, testée avec le test du Plantar (Nishinaka et al., 2015). Cependant, une autre étude de Genty et collaborateurs est en accord avec nos résultats et a observé ce même retard et diminution de l'intensité des symptômes sur un modèle de neuropathie induite par CCI chez des rats soumis à une SMN de 3h/jour de P2 à P12 (Genty et al., 2018). Dans cette étude, l'hypersensibilité mécanique nociceptive à l'état basal n'était pas observée chez les SMN, cependant après induction de la neuropathie, les rats du groupe SMN présentaient des seuils nociceptifs mécaniques (testés en Von Frey) plus haut que les animaux du groupe CTRL jusque 21 jours après la chirurgie. La même observation a été faite lors du test de plaque froide évaluant l'allodynie au froid. Les auteurs ont mis en lien ces données avec une augmentation de l'expression du gène du transporteur EAAT3 du glutamate dans la moelle épinière, qui pourrait induire plus de recapture de glutamate et diminuer la transmission spinale des informations nociceptives. De plus, au début du développement de la neuropathie une diminution de l'activation de la microglie, associée à une expression réduite des interleukines (IL) 1 $\beta$  et de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) a été mise en évidence, indiquant son implication possible dans le développement mais pas dans le maintien de la neuropathie (Genty et al., 2018). Comme notre équipe a également décrit un état sub-inflammatoire chez les animaux SMN soutenu par une expression accrue dans la moelle épinière à l'état basal de l'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  et Cox-2 (Gazzo et al., 2021), il serait intéressant de mesurer leurs niveaux après l'induction de la neuropathie pour les comparer avec les animaux du groupe CTRL au 7<sup>ème</sup> ainsi qu'au 16<sup>ème</sup> jour post-chirurgie ; qui correspondent aux moment où la différence est le plus marquée et au moment où les différences s'effacent entre les rats SMN et les CTRL, respectivement.

Dans ses études passées, notre équipe s'est également intéressée aux modifications épigénétiques induites par la SMN qui se sont révélées être durables et significatives dans

l'expression des facteurs induisant la compaction de la chromatine. Nous avons par exemple identifié une surexpression durable des ARN codants pour HDAC1, -5, -7, -8, et 11, ainsi que du micro-ARN non codant (miR) 7a, et une sous-expression des miR21 et 29 chez les rats SMN (Illouz et al., 2023; Melchior et al., 2018). MiR-7a est un ARN clé pour la nociception (principalement exprimé dans les petits neurones, considérés comme des neurones nociceptifs) et la diminution de son expression est causalement impliquée dans le maintien de la douleur neuropathique via une régulation de l'excitabilité neuronale chez les rats (Sakai et al., 2013; Sakai & Suzuki, 2015). Cependant, miR-7a est surexprimé dans notre modèle du 7ème au 45ème jour postnatal, fournissant ainsi une possible résilience contre la neuropathie. Une autre modification intéressante est celle de mir21, qui est sous-exprimé de P7 à P100 chez les animaux SMN ce qui pourrait également augmenter la neuroprotection comme cela a déjà été suggéré dans la littérature traitant des mécanismes de la maladie de Parkinson (Mao & Ding, 2019). Dans cette étude, la sous régulation de mir21 a protégé les cellules de la cytotoxicité induite par le 1-methyl-4-phenylpyridinium (agent utilisé pour modéliser les effets de la maladie de Parkinson chez la souris) en inhibant l'induction de l'apoptose, en réduisant la réponse inflammatoire et en supprimant la production d'espèces réactives de l'oxygène (produits du stress oxydatif dans les cellules).

Enfin, un autre mécanisme que je souhaiterais proposer pour expliquer ce pattern de réponse nociceptive à la suite de la pose du cuff chez les SMN concerne les contrôles descendants noradrénergiques, connus pour leur rôle dans la neuropathie. Ces contrôles jouent un rôle essentiel dans la régulation de la douleur, en particulier dans des contextes de stress. L'intégration de l'information nociceptive dans les structures supra-spinales active des structures du tronc cérébral (en particulier la PAG et locus coeruleus), y compris des fibres descendantes noradrénergiques projetant vers la corne dorsale de la ME. La fixation de la noradrénaline (NA) à ses récepteurs module l'activité des afférences primaires ainsi que des interneurones inhibiteurs, diminuant ainsi la transmission de l'information nociceptive résultant en une analgésie (**Figure 16**) (Fauss et al., 2022; Kremer et al., 2016).

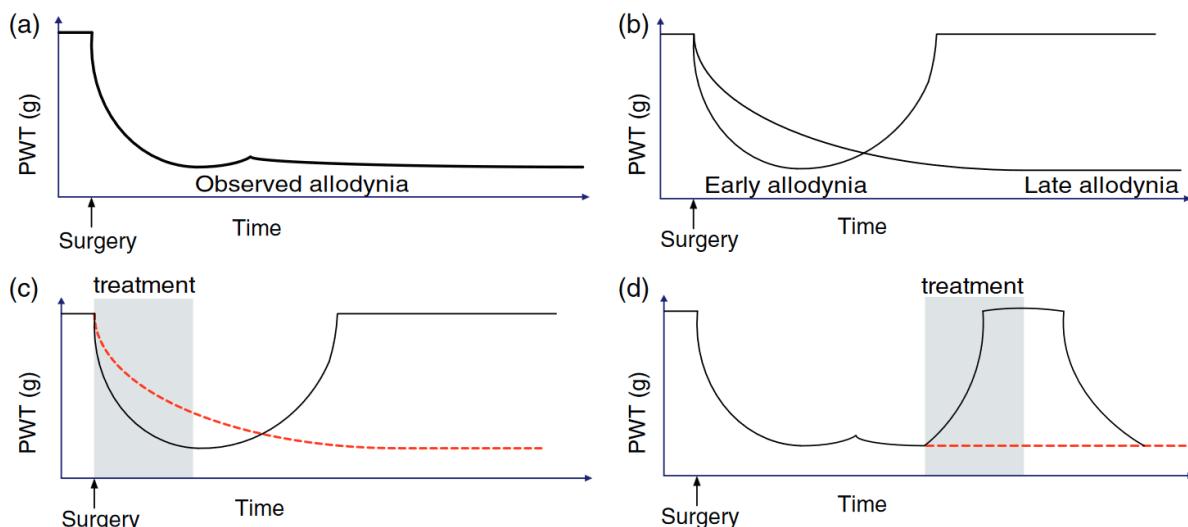


**Figure 16 : Schéma de l'action du système noradrénergique et des antidépresseurs sur la douleur neuropathique.**

D'après (Kremer et al., 2016)

Cependant, dans la période néonatale pendant laquelle le stress de SMN est appliqué, il se produit une réorganisation anatomique et fonctionnelle des systèmes noradrénergique de P0 à P7 (Rajaoefatra et al., 1992). Une SMN (3h/jour de P2 à P15) a été démontrée comme réduisant l'activité des neurones noradrénergiques dans le locus coeruleus (marquage c-Fos), participant potentiellement à un déséquilibre à l'origine de l'hypersensibilité à la douleur dans le modèle (Vilela et al., 2021). De plus, un prétraitement aigu avec un inhibiteur de la recapture de la NA, la desipramine, a permis un sauvetage de l'hypersensibilité dans un test nociceptif de formaline.

L'étude du développement de la neuropathie avec le modèle cuff dans notre laboratoire a permis de proposer l'hypothèse selon laquelle l'allodynie induite par la neuropathie est le résultat de deux mécanismes distincts (**Figure 17**) (Salvat et al., 2018). La première phase d'allodynie précoce serait due aux phénomènes transitoires suite à la lésion chirurgicale et à l'inflammation aiguë du nerf sciatique. La seconde résulterait de processus de sensibilisation sous-tendant la chronicisation de la douleur avec une progression graduelle dans les jours qui suivent la chirurgie. Ainsi, les anticonvulsivants et les antidépresseurs (dont les inhibiteurs de la recapture de la NA) peuvent bloquer l'apparition de ces mécanismes de chronicisation pendant leur développement sans bloquer l'allodynie précoce.



**Figure 17 : Illustration conceptuelle de l'impact des traitements précoce et tardif sur l'allodynie mécanique.**

L'allodynie mesurée à la suite d'une compression du nerf sciatique (a) peut être le résultat de deux mécanismes distincts (b). Les traitements précoce empêchent la chronicisation de l'allodynie en bloquant l'induction d'une allodynie tardive durablement dans le temps sans affecter l'allodynie précoce (c). Les traitements classiques à un stade plus chronique de la douleur neuropathique soulageraient temporairement l'allodynie tardive (d). Abbréviaitaion PWT : seuil de retrait de la patte. (Salvat et al., 2018).

C'est pourquoi, aujourd'hui les traitements de première ligne pour soulager la douleur neuropathique sont des antidépresseurs (dont les inhibiteurs de la recapture de la NA) (Attal et al., 2010). 30% des patients atteints de douleurs neuropathiques en Europe reçoivent des

antidépresseurs, et plus d'un tiers d'entre eux pour une durée supérieure à trois ans (McDermott et al., 2006).

Les études chez l'animal dans un modèle de « spared nerve injury » montrent que les neurones noradrénergiques du locus coeruleus et leurs terminaisons dans le noyau réticulaire dorsal, entre autres projections, facilitent la douleur et participent au développement et au maintien de l'hyperalgésie, car leur activité est renforcée après une lésion nerveuse dans la voie descendante de facilitation de la douleur (Martins et al., 2015; Taylor & Westlund, 2017).

Or comme expliqué précédemment, ces mêmes neurones NA ont une activité diminuée chez les animaux du groupe SMN. Cela pourrait expliquer pourquoi dans nos résultats au tests nociceptifs, l'hypersensibilité des rats SMN est beaucoup moins importante comparativement au groupe CTRL lors de cette première phase d'allodynie précoce, alors que la seconde semble présente. L'hypothèse que nous élaborons est la suivante : la SMN induirait une réduction de l'activité des projections noradrénergique entraînant ainsi une altération des voies descendantes inhibitrices et un déséquilibre des voies descendantes facilitatrices. A l'état basal, cela participerait à l'hypersensibilité nociceptive du modèle, mais en cas de douleur neuropathique, cela réduirait et retarderait le développement de l'allodynie. Si cet effet est confirmé, il ferait partie d'un ensemble de modifications induites par la SMN résultant en ce retard dans l'apparition des symptômes et la diminution de leur intensité, observé par notre étude en plus d'une étude précédente (Genty et al., 2018).

Pour confirmer ou infirmer cette éventualité, l'équipe pourra par la suite s'intéresser au locus coeruleus afin d'évaluer l'activation des neurones noradrénergiques grâce à un double marquage de ceux-ci en c-Fos chez les animaux SMN ou CTRL, cuff ou sham (pseudo-opérés), ou encore par l'enregistrement électrophysiologique des neurones noradrénergiques. D'autre part, une quantification des récepteurs  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 dans la corne dorsale de la ME et dans les ganglions rachidiens de ces rats permettrait de statuer sur la dérégulation potentielle du système noradrénergique de ces animaux. Enfin, pour confirmer que le retard d'installation et l'amoindrissement des symptômes de la neuropathie chez les SMN provient de ce déséquilibre, deux groupes expérimentaux pourraient être traités au moment de la chirurgie avec un agoniste ou un antagoniste des récepteurs  $\alpha$  noradrénergiques respectivement. Cette

injection intrathécale permettrait de comparer le développement de la neuropathie avec celui des animaux CTRL cuff.

Pour lier les différentes conséquences affectives et comportementales retrouvées dans cette thèse, une autre proposition d'expérience consisterait à utiliser le modèle de douleur neuropathique induite par le cuff pour évaluer la contagion de la douleur car l'expression des comportements nociceptifs (grimace, levée de patte, boitement) est très importante la première semaine après la chirurgie. En effet, les études montrent que plus l'AD montre un comportement nociceptif exacerbé, plus l'effet de la contagion est grand comme avec des injections de venin d'abeille, qui induisait une hypersensibilité chez l'AO plus forte que la condition « injections de CFA » dans l'étude de Li et collaborateurs (C. L. Li et al., 2018). En plus de l'hypersensibilité, les comportements d'anxiété et les taux de corticostérone et d'ocytocine plasmatique pourrait être mesuré chez l'AO à l'aide de la spectrométrie de masse (HPLC-MS), complétant ainsi un peu plus la caractérisation du modèle.

#### 4. A propos du modèle de SMN

Après avoir utilisé le modèle de séparation maternelle durant 3 ans, j'aimerais discuter plus en détails des avantages et limites de ce modèle, notamment en le mettant en parallèle avec les données concernant l'adversité précoce chez l'Homme. Notre équipe de recherche est en effet une équipe pluridisciplinaire dont les études transversales s'effectuent à la fois chez l'Homme et dans les modèles de laboratoire. Nos premières utilisations du modèle de SMN le présentaient en tant que modèle de recherches sur les conséquences de la prémature car le stade neurodéveloppemental à la naissance du raton est semblable à celui d'un nouveau-né prématuré né au bout de 28 semaines d'aménorrhée (M. C. White & Wolf, 2004). La SMN dans la période néonatale était présentée comme mimant le stress lié à la séparation parentale précoce (nouveau-né en couveuse) et les stress environnementaux liés à la prise en charge en hôpital (soins invasifs voir douloureux, stimuli anormaux comparativement à l'environnement *in utero* pour le nourrisson tels que la lumière ou le bruit) (Melchior et al., 2021). Cependant, même si la SMN induisait des altérations comportementales et émotionnelles, elles étaient

loin de refléter la lourde réalité clinique quant aux difficultés et problèmes de santé d'un enfant né prématuré (Melchior et al., 2021; Moster et al., 2008), la nature du rat fait qu'il naît à ce stade de développement, ce n'est pas une anomalie pour cette espèce comme ça l'est pour la nôtre. Finalement, les discussions scientifiques à propos du modèle le rapprochent plus comme mimant des abus ou de la négligence (Murthy & Gould, 2018; J. D. White & Kaffman, 2019), c'est pourquoi nous l'avons introduit dans le présent manuscrit comme modèle d'adversité précoce et non de prématurité chez l'Homme. Là encore, les études divergent quant aux conséquences de ce modèle qui n'induit pas systématiquement des comportements d'anxiété. En effet, comme introduit dans le Chapitre 1, l'espèce (rat ou souris), la souche (variabilité et prédisposition génétique) et surtout la durée des SMN (nombres d'heures par jour et nombre de jours) sont tous des facteurs induisant de la variabilité dans le phénotype de l'animal à l'âge adulte. Dans nos conditions expérimentales, on observe des déficits cognitifs comme le manque de comportement de réconfort dans le test de contagion de la douleur ou de mémoire spatiale dans l'évaluation de la neuropathie, mais pas de comportement de type anxieux dans le test du SADAC et du labyrinthe en croix, ni de déficit dans le test d'interaction, de préférence et de mémoire sociale. Mais surtout, le modèle montre de la « résilience » face au développement de la neuropathie, ce qui est l'opposé des études cliniques chez l'Homme montrant l'adversité précoce comme facteur de risque pour le développement de douleur chronique. La question qui se pose est, ne faut-il pas alors utiliser un stress d'une durée plus longue de séparation (comme les modèles allant jusqu'à P21), un stress différent comme dans le modèle du LBN (restriction des ressources nécessaires au nid, peut s'apparenter à de la négligence car l'environnement est pauvre en ressource primaire en plus de provoquer un stress chez la mère dont les comportements sont fragmentés, erratiques) ou ajouter un second stress plus tard dans l'adolescence ou à l'âge adulte (modèle de double hit) pour que le phénotype anxieux soit toujours retrouvé ? Pour la validité translationnelle de ces modèles, il serait bon de catégoriser les différents modèles de stress néonatal à la lumière des études existantes afin de les répartir par gravité et type de stress comme c'est le cas chez l'humain (foyer dysfonctionnel, abus physiques, sexuels ou émotionnels, négligence, traumas...) (Gallo et al., 2018). A ce sujet, une remarquable revue de White et Kaffman datant de 2019 ségrégue les différents modèles de stress existants selon qu'ils soient basés sur un

manque (le modèle LBN par le manque de ressource) ou un surplus de stimulations perturbant l'environnement néonatal (la SMN car les animaux sont manipulés puis disposé hors du nid) (J. D. White & Kaffman, 2019). Malgré cela, le modèle a tout de même permis de mettre en évidence de nombreux mécanismes liés au stress néonatal comme l'impact sur la myélinisation du système nerveux, l'axe HHS et le système nociceptif. Le débat scientifique pour décider si la SMN induit principalement de la résilience ou de la vulnérabilité à long terme, reste ouvert, dans nos conditions, nous observons un mélange des deux.

## 5. L'hypersensibilité à la douleur est-elle un avantage évolutif dans un environnement stressant ?

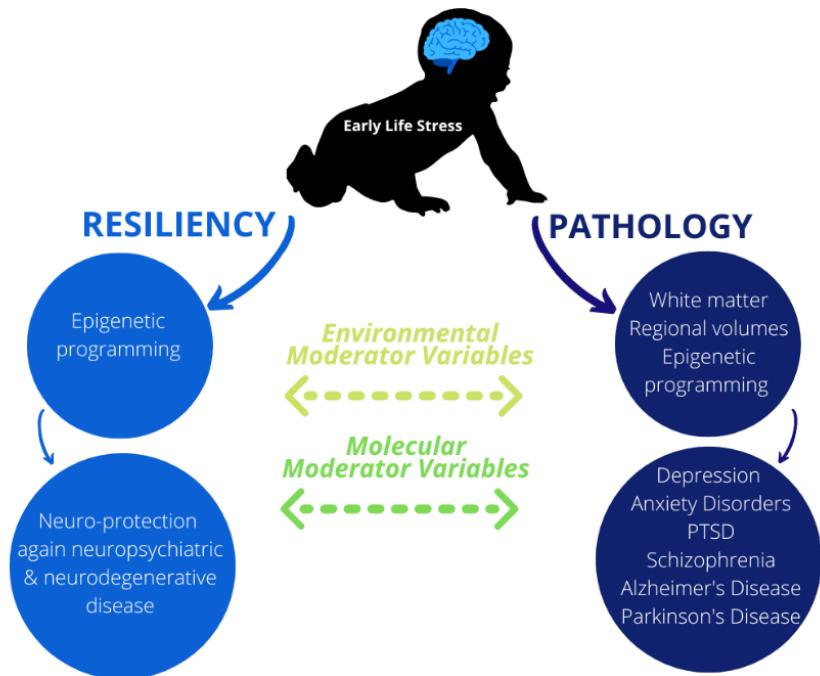
Si l'on élargit encore plus la réflexion autour de ces travaux en prenant en compte les moyens dont dispose le vivant pour s'adapter, on pourrait apporter un nouvel éclairage sur le phénotype que l'on observe à la suite de la SMN dans cette étude. Nederhof et Schmidt proposent une hypothèse de « match and mismatch » concernant l'effet du stress dans l'environnement néonatal et à l'âge adulte. De multiples expositions à un environnement aversif dans la période néonatale induiraient des mécanismes adaptatifs qui favoriseraient la survie lorsque l'environnement adulte est en adéquation avec ce dernier (match), mais seraient délétères dans le cas contraire (mismatch) (Nederhof & Schmidt, 2012).

Or notre modèle montre à la fois de la résilience et de la vulnérabilité selon le contexte dans lequel il se situe. Dans une période néonatale stressante, une acquisition plus précoce des réflexes est un avantage pour la survie du raton. L'hypersensibilité nociceptive qui est un fardeau dans un contexte sûre, est également un avantage si l'individu est dans un environnement adverse. Cela lui permet de se soustraire plus rapidement à un stimulus menaçant son intégrité physique. Le déficit de comportement pro-sociaux, à l'échelle du groupe, pour un environnement sûre ou aversif, reste à notre avis un désavantage certain. Enfin, pour le développement de la neuropathie, les altérations diverses de la SMN au niveau épigénétique, fonctionnel et comportemental sur l'organisme ont induit une « résilience » face à son développement, et donc du point de vue de cette hypothèse, c'est également un avantage.

Collins et collaborateurs dans une revue récente, proposent une idée similaire basée sur une balance entre résilience et pathologie (**Figure 18**) (Collins et al., 2023) car les personnes ayant subi de l'adversité précoce ne développent pas toutes des pathologies à l'âge adulte et présentent parfois même la capacité à s'adapter et à persévérer en dépit d'une adversité permanente. L'étude questionne donc les mécanismes qui font pencher la balance vers la pathologie ou la résilience en plus des différences qui nous sont intrinsèques comme notre patrimoine génétique. Entrent donc en compte, les facteurs environnementaux qui peuvent moduler les conséquences de l'adversité précoce de la même manière que les modérateurs

moléculaires tels que les polymorphismes nucléotidiques et les marqueurs épigénétiques. C'est également ce qui pourrait expliquer le comportement parfois très variable des groupes d'animaux testés d'une étude à une autre, d'une souche à une autre, d'une portée à une autre, d'un animal à un autre...

Cela laisse donc l'opportunité en recherche d'évaluer spécifiquement les individus d'un groupe qui présentent de la résilience ou d'augmenter les effectifs des études afin d'établir des liens de causalité entre des facteurs de risque et une pathologie donnée.



**Figure 18 : Schéma des conséquences de l'adversité précoce, entre résilience et pathologie.**

Les phénotypes pathologiques ou résilients sont induits au cours du développement par le stress provoquant des multiples changements qui prédisposent un individu à une vulnérabilité ou à de la résilience à l'âge adulte face aux pathologies. Le penchement de la balance vers la pathologie ou la résilience peut être influencé par des modérateurs environnementaux, tels que l'adversité précoce, ainsi que des modérateurs internes, tels que les polymorphismes génétiques. (Collins *et al.*, 2023).

## 6. Conclusion générale

Lors de cette thèse, l'analyse des diverses conséquences de la SMN nous a permis de mettre en évidence des altérations comportementales et émotionnelles en début de vie et à l'âge adulte. Si les fonctions essentielles pour la survie de l'individu (fonctions sensori-motrices évaluées dans la période néonatale) ne semblent pas être impactées de manières délétères, d'autres fonctions plus fines comme celles régissant la nociception et les comportements prosociaux (empathie à la douleur) sont impactées sur le long-terme. Cependant, dans des conditions particulières comme le développement d'une neuropathie à l'âge adulte, ces altérations confèrent à ce phénotype un développement retardé et moins intenses des symptômes.

Au regard de l'importance de ce sujet dans le domaine de la santé publique, il est fondamental d'approfondir l'analyse des mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents. Cette démarche est d'un intérêt majeur pour le suivi des enfants, qu'ils soient nés prématurés ou non, qu'ils aient subi des perturbations périnatales ou des évènements adverses en début de vie.

## V. Revue

L'annexe contient la revue traitant de l'empathie chez l'humain et de la contagion émotionnelle chez l'animal :

**Brik Y.** et Melchior M., (2022) La question de l'empathie à la douleur et de l'impact de l'environnement néonatal. *Douleur et Analgésie*, 35, 188-195

# La question de l'empathie à la douleur et de l'impact de l'environnement néonatal

## The question of empathy to pain and the impact of the neonatal environment

Y. Brik · M. Melchior

Reçu le 4 août 2022 ; accepté le 2 septembre 2022  
© Lavoisier SAS 2022

**Résumé** L'empathie, notamment l'empathie à la douleur, constitue une importante question de recherche. Elle joue en effet un rôle fondamental dans les processus sociaux chez de nombreuses espèces animales et chez l'homme. Cette revue regroupe dans un premier temps les données cliniques et animales connues sur l'empathie à la douleur et les réseaux neuronaux qui la sous-tendent. Ensuite, elle s'intéresse aux données qui démontrent un impact de l'environnement précoce sur le développement des processus d'empathie à la douleur. Plusieurs publications suggèrent en effet que dans les cas de prématurité ou de trauma dans l'enfance, les capacités d'empathie à la douleur sont impactées.

**Mots clés** Empathie · Douleur · Stress précoce · Séparation maternelle

**Abstract** Empathy, in particular empathy to pain, is an important research question. It indeed plays a key role in social processes in many animal species and in human. This review summarizes the clinical and animal data on empathy to pain and its neuronal network. Then, it discusses the data showing an impact of early life environment on the development of empathy to pain processes. Several publications indeed sug-

gest that in the case of preterm birth or trauma during early childhood, empathy to pain abilities can be impacted.

**Keywords** Empathy · Pain · Early life stress · Maternal separation

## Introduction

La thématique de l'empathie constitue une importante question de recherche, qui s'est développée de plus en plus au cours des dernières années. En particulier, les questions de l'empathie à la douleur et des réseaux neuronaux qui la sous-tendent ont fait l'objet de nombreuses publications scientifiques.

D'un point de vue évolutif, l'empathie est au cœur des processus sociaux chez de nombreuses espèces animales, y compris l'homme. Plusieurs espèces présentent en effet des comportements de contagion émotionnelle et/ou de consolation, qui se rapprochent de l'empathie [1]. Cette habileté confère un potentiel de survie important pour les membres d'un groupe. Elle permet d'être réceptif aux états émotionnels d'autrui, un aspect essentiel des relations sociales et de la coopération entre les individus. La question de l'empathie à la douleur de l'autre est d'autant plus cruciale, car la douleur joue un rôle fondamental de protection, elle avertit d'un danger réel ou potentiel qui peut menacer l'intégrité physique de l'individu. Estimer l'inconfort et la douleur des autres donne ainsi des indications clés sur l'existence de potentiels dangers et favorise également l'apparition de comportements prosociaux d'aide, de réconfort ou de soin. Cette capacité d'empathie à la douleur est donc au cœur des processus sociaux, que cela soit dans les relations avec nos proches, de parfaits inconnus, ou bien sûr dans le milieu médical où elle rythme la rencontre entre le soignant et ses patients.

Il est donc important de s'intéresser aux situations qui engendrent des dysfonctions de ces processus d'empathie. Une altération de l'empathie, y compris de l'empathie à la

---

Y. Brik  
Institut des neurosciences cellulaires et intégratives

(CNRS UPR 3212),  
Centre national de la recherche scientifique  
et université de Strasbourg,  
8, allée du Général-Rouville, F-67000 Strasbourg, France

M. Melchior (✉)  
Laboratoire de neurosciences cognitives et adaptatives  
(CNRS UMR 7364),  
Centre national de la recherche scientifique  
et université de Strasbourg,  
12, rue Goethe, F-67000 Strasbourg, France  
e-mail : mmelchior@unistra.fr

douleur, est suggérée chez des patients souffrant de douleur chronique, par exemple dans le cas de douleurs musculosquelettiques [2], fibromyalgie [3], mais aussi dans des cas de pathologies de type autisme [4] ou schizophrénie. Dans notre laboratoire, nous nous intéressons particulièrement aux événements traumatisques, qui engendrent un stress et/ou une douleur, autour de la période périnatale et tentons de comprendre, via des études chez l'homme et l'utilisation de modèles animaux, si ces événements peuvent altérer les réponses à la douleur et la capacité d'empathie à la douleur au cours de la vie.

## Empathie et empathie à la douleur, que connaît-on sur le sujet ?

Un premier terme précurseur de ce concept moderne qu'est devenu l'empathie nous vient de Robert Vischer en Allemagne, qui a introduit le concept d'*Einfühlung* dans le contexte des arts. Theodore Lipps a ensuite intégré ce concept dans le domaine de la psychologie au début du xx<sup>e</sup> siècle. Mais qu'est donc que cette « empathie » ? Une définition simple dirait qu'il s'agit de la capacité à se mettre à la place d'autrui pour comprendre ses émotions et sentiments. Si l'on va plus loin, l'empathie est un processus complexe qui inclut la capacité à se représenter l'état émotionnel d'autrui et d'induire des réponses affectives chez un observateur, ce qui correspond à la composante émotionnelle de l'empathie, mais aussi la capacité d'adopter la perspective de l'autre, de comprendre les raisons qui l'ont amené à ressentir cette émotion et à mettre en place des stratégies pour réguler sa propre émotion face à celle d'autrui [1,5,6]. Dans ce cas, on parle plutôt de la composante cognitive de l'empathie. Certains auteurs suggèrent de ce fait l'existence d'un système d'empathie à trois facteurs : la contagion émotionnelle (i.e. capacité de répliquer automatiquement les émotions d'autrui, aussi nommée résonance émotionnelle ou résonance affective), l'empathie cognitive (i.e. comprendre et intellectualiser les émotions de l'autre) et la déconnexion émotionnelle (i.e. la régulation de la réponse empathique par une déconnexion par rapport aux émotions d'autrui, liée aux fonctions exécutives et contrôles top-down). L'empathie s'associe également à une motivation altruiste, à une volonté d'aider l'autre et de participer à son bien-être. L'empathie se fonde sur plusieurs indices émotionnels, à la fois posturaux, langagiers, ou l'expression faciale.

Chez l'homme, elle est couramment étudiée via des paradigmes utilisant des images ou films animés représentants des personnes dans des situations de douleur ou via des paradigmes où le sujet d'étude observe une personne qui reçoit des stimulations douloureuses. Les films/photos utilisés sont une source de variabilité dans les différentes études, notamment au niveau de la présence ou non du visage (et donc la possibilité d'utiliser des indices d'expression faciale), du

genre et de l'origine des individus, du degré de familiarité, ou encore de l'attractivité de la personne représentée ou l'utilisation de cartoons plutôt que des images réelles.

Les études d'imagerie ont permis d'identifier les réseaux neuronaux mis en cause dans ces processus [6]. Dans le cas de l'empathie à la douleur, une théorie de la « représentation partagée » suggère que l'empathie à la douleur des autres repose sur les mêmes substrats neuronaux et psychologiques que ceux qui sont impliqués lorsque l'on ressent soi-même de la douleur. Des études ont en effet montré que l'expérience empathique (observations d'expressions faciales de douleur, de corps en situation de douleur ou encore lorsque le sujet reçoit l'information que son partenaire subit une stimulation douloureuse) active certaines zones cérébrales qui sont également activées lors d'une stimulation douloureuse, notamment le cortex cingulaire antérieur dorsal et médial et l'insula antérieure, mais aussi le cervelet ou encore le gyrus frontal inférieur [6,7]. De manière intéressante, il semblerait que les capacités d'empathie à la douleur soient liées à notre propre sensibilité à la douleur. Une population avec une forte sensibilité à la douleur évalue ainsi de manière plus intense la douleur ressentie par autrui et la désagréabilité face à la douleur des autres [8]. À l'inverse, il a été montré qu'observer la douleur d'autrui change notre propre réponse à la douleur en réponse à des stimulations nociceptives, un phénomène décrit sous le terme d'*hyperalgesie compassionnelle* [9]. Néanmoins, l'étude de Danziger et al., en 2009, sur des sujets atteints d'une insensibilité congénitale à la douleur démontre qu'il n'est pas nécessaire d'être capable de ressentir soi-même de la douleur pour faire preuve d'empathie vis-à-vis de la douleur d'autrui, ce qui montre que ce principe de résonance et de représentation partagée n'est pas un pré-requis à l'empathie [10].

## Développement de l'empathie

D'un point de vue développemental, les réponses émotionnelles et d'empathie se mettent progressivement en place au cours des premières années [11]. Les réponses affectives apparaissent tôt, avec des processus de mimétisme (*mimicry*) et de résonance bien décrits, alors que la composante cognitive, notamment les capacités de prise de perspective, de distinction du soi et des autres ou encore la régulation des émotions, met plus de temps à se mettre en place, en lien avec la maturation des processus top-down de régulation associés aux fonctions exécutives.

Dès la première année, les enfants font ainsi preuve de contagion émotionnelle et présentent des comportements de détresse à l'écoute de leurs propres pleurs ou de ceux d'un autre nouveau-né [12]. À l'âge de dix semaines, ils semblent reconnaître et être capables, dans une certaine mesure, de copier les expressions faciales de leur mère [13]. Très tôt,

les enfants sont également capables de présenter des comportements prosociaux en réponse à la détresse d'une autre personne. C'est par exemple le cas dans des expériences où, face à la détresse d'un adulte qui brise sa cuillère alors qu'il tente de déguster son dessert, l'enfant entre 15 et 24 mois met en place des comportements de soutien, lui prête sa cuillère par exemple [14]. Cette capacité semble se développer parallèlement à celle de se reconnaître dans un miroir, et donc à la capacité de faire une réelle distinction entre soi et autrui, menant à des réponses émotionnelles plus fines et structurées. Des enfants du même âge, entre 18 et 25 mois, sont capables de mettre en place un comportement prosocial envers un adulte qui se fait voler ou détruire ses biens [15]. Cela est observé même lorsque l'adulte ne montre aucun signe émotionnel, ce qui suggère que l'enfant présente une capacité de prise de perspective.

Concernant la douleur, la capacité à discriminer les expressions faciales de douleur a été mise en évidence dès trois ans et s'améliore et se raffine avec l'âge jusqu'à environ 11–12 ans [16]. Ils sont également capables très tôt, vers 6–7 ans, d'évaluer l'intensité de situations douloureuses qui leur sont présentées à l'oral, à l'aide d'une échelle de visages à 3 ou 6 niveaux [17]. Il semblerait que la capacité de scorer la douleur dans des situations impliquant des membres du corps (i.e. qui recrute plutôt des processus de partage émotionnel) se développe plus tôt que la capacité à scorer la douleur sur des visages (ce qui recrute plutôt des capacités cognitives plus élaborées) [16].

Au niveau de l'activité cérébrale, une étude en IRM fonctionnelle a étudié l'évolution de l'empathie selon l'âge et montre que le scoring subjectif de stimuli visuels montrant des personnes accidentellement ou volontairement blessées diminue avec l'âge des participants. Une plus forte activation de l'amygdale, l'insula et le cortex préfrontal ventromédian est également observée chez les plus jeunes lorsqu'on leur présente des courts films animés représentant des personnes en situation de douleur [18]. Lorsque les situations présentent une personne ressentant une douleur infligée de manière intentionnelle par une autre personne, des zones impliquées dans les représentations sociales et le comportement moral sont également activées (jonction temporopariétale, paracingulaire, cortex frontal orbitomédial, amygdale) [19]. Une étude en MEG a mis en évidence que, lors d'une tâche d'empathie à la douleur, des oscillations alpha sont observées au niveau du cortex somatosensoriel chez l'enfant, alors que chez l'adulte des oscillations gamma et bêta sont observées au niveau du cortex viscéromoteur, suggérant une maturation des processus d'empathie, d'abord rudimentaires et centrés sur le soi puis plus complexes et centrés sur autrui [20]. Au niveau EEG, des potentiels évoqués par des tâches d'empathie à la douleur (comme la présentation d'images) peuvent être mesurés et se constituent d'un composant précoce et d'un composant plus tardif. Le composant précoce qui reflète un

traitement automatique semble plus précoce chez les adolescents que chez l'adulte et diminue en amplitude avec l'âge, alors que le composant tardif, qui reflète l'évaluation cognitive, augmente en amplitude avec l'âge [21].

## Quand l'environnement précoce module l'empathie

Si l'empathie se développe graduellement pendant l'enfance, il est tentant de supposer que des événements ayant lieu tôt dans la période néonatale ou plus tard courant l'enfance pourraient avoir un impact sur sa mise en place. De même, elle dépend de fonctions exécutives, notamment liées au cortex préfrontal, qui sont connues pour être impactées, par exemple, suite à la grande prémature [22]. En effet, quelques études suggèrent que les traumas précoce peuvent impacter le développement socioémotionnel des enfants. Par exemple, les enfants grands prématués présentent une plus grande réactivité à la colère à 12 mois par rapport à des enfants du même âge, mais nés à terme, et une plus grande réactivité motrice face à un événement de joie [23]. Ils peuvent également présenter une difficulté à reconnaître des émotions faciales à l'âge de 42 mois [24], et, à l'âge de deux et sept ans, les grands et extrêmes prématués présenteraient des difficultés socioémotionnelles, notamment d'empathie, mesurées par les échelles Infant-Toddler Social and Emotional Assessment ou la Kids Empathy Development Scale, respectivement [25,26]. À l'âge adulte, l'histoire de trauma semble liée à une baisse des scores d'empathie affective mesurée par le Multifaceted Empathy Test et l'Empathy Quotient [27]. Au niveau cérébral, le stress précoce n'a pas d'effet global sur les réponses dans une tâche d'empathie, mais le niveau d'activation des structures liées à l'empathie semble corrélé à la synchronisation du lien mère-enfant, dans le cas d'un trauma lié à la guerre dès l'enfance, chez des enfants vivants dans des villages proches de la borne de Gaza [28]. Cette corrélation a aussi été démontrée dans le cas de la prémature chez des sujets nés en moyenne à ~32 semaines de gestation [29].

Concernant la douleur, quelques indices de la littérature suggèrent que la relation des anciens prématués à la douleur est impactée, comme dans l'étude de Grunau et al. qui ont demandé à des enfants de huit à dix ans de scorer la douleur présente sur des images représentant des situations douloureuses dans des situations médicales (subir une piqûre par exemple), de récréation (par exemple tomber à skateboard), de la vie de tous les jours (se bloquer le doigt dans une porte par exemple) ou de douleur psychosociale (être exclu d'un jeu par exemple) [30]. Dans un contexte de récréation, les enfants avec un petit poids de naissance ( $\leq 1\ 000$  g) et nés entre 23 et 31 semaines de gestation scorent la douleur plus intensément que les enfants témoins. Les résultats pour les autres situations, s'ils n'étaient pas significatifs, montraient

cependant une tendance à évaluer la douleur comme plus intense par les enfants avec petit poids de naissance. Ces enfants scorent aussi la douleur médicale plus intensément que les autres types de douleur, alors qu'il n'y a pas de différences chez les témoins. Plus récemment, une étude suggère que le trauma précoce semble corrélé à l'activité cérébrale mesurée en EEG lors d'une tâche d'empathie à la douleur chez des patients atteints d'un trouble de la personnalité (Borderline Personality Disorder) [31].

Que cela soit dans la régulation des réponses à la douleur, la régulation du stress ou la modulation des comportements sociaux, une molécule semble jouer un rôle clé : l'ocytocine. Ce neuropeptide est très important autour de la naissance, permettant l'accouchement et la lactation, mais est également impliqué dans la mise en place de l'attachement. Au cours de la vie, l'ocytocine joue également un rôle important dans les processus sociaux, dans lesquels la reconnaissance des émotions d'autrui est essentielle. Or, plusieurs études suggèrent que le comportement maternel et les processus d'attachement qui en découlent sont importants dans la mise en place des comportements d'empathie. Une mété-analyse récente suggère que l'attachement sécurisé favorise effectivement les capacités empathiques chez l'enfant et l'adolescent [32]. Par ailleurs, des études récentes chez l'animal montrent un dysfonctionnement du système ocytocinergique suite à une séparation maternelle néonatale entre le 2<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour postnatal, impactant à long terme les réponses à la douleur, le stress et les comportements sociaux. Ce modèle animal vise à mimer ce qui peut se passer dans les cas de naissance prématuée, lorsque l'enfant est privé des interactions parentales précoces. Cependant, des injections d'ocytocine durant la période de séparation se sont montrées efficaces pour restaurer ces comportements [33,34]. Le rôle de l'ocytocine dans l'empathie est parfois controversé, mais différents indices suggèrent qu'elle jouerait un rôle, au moins partiel, dans la régulation des réponses d'empathie. Une étude a en effet montré que lorsque des participants regardent des scènes émotionnelles, leurs scores empathiques sont associés à des taux élevés d'ocytocine sanguine [35]. L'application intranasale d'ocytocine semble également augmenter la réponse empathique chez les hommes [36] ou encore augmenter les capacités de reconnaissance des émotions dans le Reading the Mind in the Eye Test (RMET) test [37]. Les variations génétiques du récepteur à l'ocytocine (OTR) influencent également les comportements d'empathie [38]. Il existe en effet un variant rs53576, présentant un polymorphisme au niveau l'intron 3. Les individus avec deux copies de l'allèle A (AG/AA) présentent une empathie plus faible que les individus homozygotes pour l'allèle G (GG). Nous pourrions donc raisonnablement émettre l'hypothèse que le déficit d'ocytocine lié à une séparation maternelle précoce puisse induire également un déficit d'empathie et d'empathie à la douleur.

## Ce que les modèles animaux nous apprennent sur l'empathie à la douleur et l'impact de l'environnement précoce

### Empathie à la douleur chez l'animal

Chez l'animal, Panksepp et Panksepp proposent la notion d'empathie primaire qui renvoie à la contagion ou à la résonance des états émotionnels. Cette définition s'abroge des fonctions cognitives complexes qui sont recrutées chez l'Homme et se fonde sur l'expression de ces états émotionnels partagés [39]. Ainsi, sur la base d'indices démontrant l'existence de la contagion émotionnelle chez le rongeur pour des émotions fortes telles que la peur ou la douleur, des études ont été menées chez ces derniers afin de mettre en évidence les mécanismes et circuits neuronaux à l'origine de l'empathie primaire, un mécanisme neurocomportemental conservé à travers les espèces.

La majeure partie des études menées sur l'empathie primaire ou la contagion émotionnelle porte sur la peur ou sur la douleur [40]. Dans le cadre de cette revue, notre intérêt porte plus particulièrement sur la contagion émotionnelle à la douleur chez le rongeur. Dès 1959, une étude portant sur le conditionnement émotionnel lié à la peur et la douleur chez le rat rapporte que ces derniers, à l'état basal, réagissent à la douleur de leurs congénères subissant un choc électrique, par un comportement d'anxiété exacerbé [41]. Les groupes d'animaux ayant subi eux-mêmes ces chocs présentaient un comportement d'anxiété encore plus important, et cela sur une dizaine de jours. Ces réactions furent interprétées comme un cas de « sympathie » envers le congénère.

Depuis, afin d'évaluer cette contagion émotionnelle, différents tests furent élaborés à partir d'un modèle général comprenant un animal « démonstrateur » recevant un stimulus nociceptif (celui qui éprouve l'émotion et qui la transmet) et un second animal « observateur » (celui à qui l'émotion est transmise). Lors du test, l'observateur est exposé à un démonstrateur (i.e. installé dans une même cage) juste après l'application du stimulus douloureux à l'animal démonstrateur pour une durée variable (interaction minimum de 30 minutes jusqu'à l'hébergement dans une cage commune pour plusieurs jours). Durant cette période, l'interaction des animaux est observée afin d'étudier et de mesurer leurs comportements dits de « consolation » fondés sur l'empathie envers un partenaire en détresse : l'alloléchage et l'allotoilettage [42]. À la fin de l'interaction, afin de tester la potentielle contagion émotionnelle, les seuils nociceptifs de différentes modalités (thermique ou mécanique) des animaux ainsi que leurs comportements d'anxiété sont évalués [40]. Les protocoles utilisés dans la littérature vont différer autour de variables telles que la durée du test, la nature du stimulus utilisé, les modalités nociceptives étudiées, la

familiarité des animaux (congénères ou étrangers, souches, sexes), l'hébergement des animaux ou encore la réalisation ou non d'une préexposition de l'animal observateur au stimulus douloureux [40]. Ce type de protocole évalue la contagion ou le transfert social de la douleur, mais peut être adapté pour évaluer l'effet tampon (*social buffering*) et l'analgésie sociale (*social analgesia*) [39].

Les études montrent une modulation de la sensibilité douloureuse après une interaction avec un congénère éprouvant de la douleur [43,44]. En effet, si des animaux sont congénères (familiers, car hébergés ensemble), l'observation d'un compagnon soumis à une douleur inflammatoire altère de manière significative la sensibilité à la douleur de l'animal observateur, et cela même pour une modalité entièrement différente, suggérant que les mécanismes nociceptifs en général sont sensibilisés [43,42]. De manière semblable, une autre étude démontre que des animaux hébergés et testés dans la même pièce que d'autres soumis à une douleur inflammatoire, à un sevrage de la morphine ou de l'alcool développent une hyperalgésie concordante [44]. Le terme de *social priming* est également utilisé pour décrire l'augmentation de la sensibilité à la douleur chez un individu après qu'il a été en interaction avec un démonstrateur familial [42,45].

Le phénomène fut également étudié dans des modèles de douleur neuropathique par constriction du nerf sciatique où des résultats similaires sont obtenus lors de l'évaluation de la sensibilité nociceptive après une longue période de cohébergement (14 jours). Les animaux hébergés dans la même cage que les animaux neuropathiques présentent une hypersensibilité ainsi qu'un comportement d'anxiété plus important [42,46], suggérant un effet sur les réponses sensorielles nociceptives, mais aussi affectives [46].

Toujours dans le cas d'un test de contagion à la douleur, mais en s'intéressant cette fois à l'effet sur l'animal démonstrateur, on observe une réduction de sa réactivité à un stimulus douloureux si un congénère (non douloureux) est présent. Ce phénomène est appelé *social buffering* ou effet tampon [47,48]. Autre fait intéressant observé, si les deux congénères hébergés ensemble reçoivent tous les deux le stimulus douloureux, leur comportement douloureux est plus important que si seulement l'un d'entre eux reçoit le stimulus douloureux [43]. Enfin, l'analgésie sociale a également été testée dans cette même configuration : les deux animaux reçoivent le stimulus nociceptif, et si l'un d'entre eux reçoit un analgésiant, on observe alors une diminution de la douleur chez l'autre animal [49]. À noter que, dans la majorité des études, ces phénomènes sont absents lorsque les individus testés ne sont pas familiers. Le comportement douloureux d'un individu est donc influencé de manière bidirectionnelle par l'état dans lequel se trouve son congénère.

Plusieurs études ont tenté d'identifier les modalités sensorielles mises en jeu dans la contagion émotionnelle chez le rongeur, en utilisant des dispositifs de test permettant à l'animal « observateur » de constater l'état comportemental de l'animal « démonstrateur » via un seul sens ou avec le sens étudié supprimé. Ainsi, Mogil et al. démontrent qu'en bloquant la vue, les co-occurrences de l'expression des comportements liés à la douleur ainsi que l'hyperalgésie étaient absentes, voire complètement annulées [43]. De même, les signaux olfactifs présents dans l'environnement suffisent à induire une hyperalgésie chez les animaux hébergés et testés dans la même pièce que ceux recevant un stimulus nocif [44]. Enfin, concernant l'ouïe, une étude sur le sujet démontre que les vocalisations seules d'un individu soumis à un stimulus douloureux sont insuffisantes pour induire une contagion émotionnelle [50].

Vient enfin la question du cheminement de l'information et des structures cérébrales impliquées dans ce phénomène d'empathie primaire. Une étude récente de Smith et al. permet d'apporter plus de lumières sur ce sujet grâce à un protocole impliquant l'utilisation de l'optogénétique lors des tests de transfert social de la douleur, de transfert de l'analgésie et de transfert de la peur afin de mettre en évidence les circuits neuronaux activés [49]. Les résultats suggèrent que le transfert social de la douleur et de l'analgésie impliquent tous deux des projections des neurones du cortex cingulaire antérieur (également activé lors d'une expérience douloureuse) vers avec le noyau accumbens. Pour le transfert social de la peur, ce sont des projections depuis le cortex cingulaire antérieur vers l'amygdale basolatérale qui sont impliquées. La comparaison des résultats avec ceux obtenus chez l'homme est intéressante, car on retrouve une implication du cortex cingulaire antérieur dans la contagion émotionnelle de la douleur.

### Stress précoce et contagion émotionnelle

Les études chez l'homme suggèrent que l'environnement précoce, la prématurité ou l'attachement peuvent avoir des effets sur la mise en place des comportements d'empathie. Or, nous ignorons encore quels sont les facteurs clés et les mécanismes sous-jacents. Dans ce cadre, les modèles animaux peuvent aider à identifier ces mécanismes et à proposer des stratégies pour contrecarrer l'effet de l'environnement précoce sur le développement de ces comportements. Plusieurs modèles animaux, notamment chez le rongeur, existent pour modéliser l'impact des stress précoce, par exemple des modèles de douleurs répétées dans la période néonatale, de séparation maternelle répétée, de sevrage précoce, ou encore de *limited bedding* où seul le minimum de matériel pour faire le nid est fourni aux mères [51]. Ces modèles ont pour la plupart un impact sur le stress maternel et induisent une baisse du comportement maternel.

Une récente étude de Kalamari et al. a comparé l'impact d'un stress de privation maternelle néonatale (24 heures au troisième jour postnatal) à celui d'un enrichissement durant la période juvénile (à partir du 26<sup>e</sup> jour postnatal) sur les comportements sociaux chez le rat, notamment la motivation à libérer un congénère d'un cylindre [52]. Les rats sont en effet entraînés à ouvrir la porte du cylindre en appuyant sur un levier. Pour mesurer la libération à libérer leur congénère, le nombre de pressions sur le levier requis avant l'ouverture de la porte augmente progressivement au cours des sessions. Les résultats montrent une tendance à la baisse de motivation à libérer leur congénère pour les rats ayant subi le stress de privation maternelle mais que, de manière assez surprenante, celle-ci était significativement plus basse chez les animaux du groupe enrichissement. Dans un test similaire d'empathie, visant à mesurer la motivation à libérer un congénère enfermé dans un compartiment piscine, il a été suggéré que la quantité de comportement maternel module le comportement empathique. Les animaux ayant reçu un important taux de comportement maternel libèrent en effet davantage leurs congénères au cours des sessions [53]. Le phénomène de *social buffering* semble également impacté chez des rats femelles soumises à un protocole de *limited bedding*, dans le contexte d'une exposition à un stress modéré (environnement nouveau) [54].

Concernant la contagion de la douleur, il a été montré qu'un sevrage précoce a un impact sur ces comportements à l'âge adulte [55]. Chez des souris témoins recevant une injection intrapéritonéale d'acide acétique, on observe que les comportements de douleur sont diminués lorsqu'ils sont mis en cohabitation avec un congénère sain non injecté (*social buffering*), mais augmentés lorsque les deux animaux reçoivent l'injection. Au contraire, cela n'est pas observé dans le groupe ayant eu un sevrage précoce. Plus récemment, Laviola et al. rapportent dans une étude récente que les descendants de mères ayant un fort taux de corticostérone et un comportement maternel faible présentent à l'âge adulte moins de contagion émotionnelle de la douleur, suggérant un rôle important du comportement maternel [56]. Dans une seconde étude, ils démontrent un impact délétère des stress chroniques pré- et néonataux, modélisés par une exposition à la corticostérone dans l'eau de boisson durant la gestation ou la lactation, sur la contagion à la douleur dans un modèle murin [57]. En effet, l'équipe a observé qu'à l'âge adulte, les animaux présentaient une diminution de leur capacité d'empathie lorsque leur congénère reçoit une injection intraplantaire de formaline ainsi que des réponses exacerbées face à un stress aigu. Ces changements sont associés à des modifications des niveaux d'expression centraux des récepteurs aux corticoïdes, mais aussi des récepteurs oxytocinergiques et opioïdériques. Dans cette étude, un traitement intranasal à l'ocytocine a été capable de restaurer un comportement normal de contagion émotionnelle.

## Conclusion

À notre connaissance, il existe encore peu d'études dans la littérature s'intéressant spécifiquement à la question de l'impact du stress précoce sur les comportements d'empathie à la douleur. C'est pourquoi notre laboratoire s'y intéresse à la fois chez l'Homme et chez l'animal en l'étudiant à l'aide d'un modèle de stress de séparation maternelle néonatale.

Les principales études publiées dans la littérature suggèrent néanmoins que le stress ayant lieu précocement peut impacter le comportement social, la motivation à libérer un congénère d'un environnement stressant, ou encore le fonctionnement du système oxytocinergique qui est impliqué dans les processus d'empathie et dans la régulation des réponses à la douleur. Différents indices permettent donc de suggérer un éventuel impact du stress précoce, comme la séparation maternelle ou la prématurité, sur les comportements d'empathie à la douleur.

**Remerciements** Les recherches menées par les auteures sont soutenues par l'université de Strasbourg et le Centre national pour la recherche scientifique. Ces recherches bénéficient du soutien de la région Grand Est dans le cadre du projet du Fond régional de coopération pour la recherche CLueDol : Comprendre et lutter ensemble contre la douleur. Y.B. est soutenue par le programme d'investissement d'avenir Euridol Graduate School of Pain. Ce travail a été publié dans le cadre de l'Idex Université de Strasbourg

**Liens d'intérêts** : les auteures déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt.

## Références

1. Preston SD, de Waal FB (2002) Empathy: its ultimate and proximate bases. *Behav Brain Sci* 25:1–20; discussion 20–71
2. Zhang HB, Ou H, Meng DH, et al (2021) Impaired cognitive empathy in outpatients with chronic musculoskeletal pain: a cross-sectional study. *Neural Plast* 2021:4430594
3. de Tommaso M, Ricci K, Conca G, et al (2019) Empathy for pain in fibromyalgia patients: an EEG study. *Int J Psychophysiol* 146:43–53
4. Meng J, Li Z, Shen L (2017) Responses to others' pain in adults with autistic traits: the influence of gender and stimuli modality. *PLoS One* 12:e0174109
5. Decety J, Lamm C (2006) Human empathy through the lens of social neuroscience. *Sci World J* 6:1146–63
6. Bernhardt BC, Singer T (2012) The neural basis of empathy. *Annu Rev Neurosci* 35:1–23
7. Jackson PL, Meltzoff AN, Decety J (2005) How do we perceive the pain of others? A window into the neural processes involved in empathy. *Neuroimage* 24:771–9
8. Li X, Liu Y, Ye Q, et al (2020) The linkage between first-hand pain sensitivity and empathy for others' pain: attention matters. *Hum Brain Mapp* 41:4815–28

9. Godinho F, Faillenot I, Perchet C, et al (2012) How the pain of others enhances our pain: searching the cerebral correlates of “compassional hyperalgesia”. *Eur J Pain* 16:748–59
10. Danziger N, Faillenot I, Peyron R (2009) Can we share a pain we never felt? Neural correlates of empathy in patients with congenital insensitivity to pain. *Neuron* 61:203–12
11. Tousignant B, Eugene F, Jackson PL (2017) A developmental perspective on the neural bases of human empathy. *Infant Behav Dev* 48:5–12
12. Dondi M, Simion F, Caltran G (1999) Can newborns discriminate between their own cry and the cry of another newborn infant? *Dev Psychol* 35:418–26
13. Haviland JM, Lelwica ML (1987) The induced affect response: 10-week-old infants’ responses to three emotion expressions. *Dev Psychol* 23:97–104
14. Bischof-Köhler D (2012) Empathy and self-recognition in phylogenetic and ontogenetic perspective. *Emot Rev* 4:40–8
15. Vaish A, Carpenter M, Tomasello M (2009) Sympathy through affective perspective taking and its relation to prosocial behavior in toddlers. *Dev Psychol* 45:534–43
16. Gregoire M, Bruneau-Bherer R, Morasse K, et al (2016) The perception and estimation of others’ pain according to children. *Pain Res Manag* 2016:9097542
17. Decruynaere C, Thonnard JL, Plaghki L (2009) How many response levels do children distinguish on faces scales for pain assessment? *Eur J Pain* 13:641–8
18. Decety J, Michalska KJ (2010) Neurodevelopmental changes in the circuits underlying empathy and sympathy from childhood to adulthood. *Dev Sci* 13:886–99
19. Decety J, Michalska KJ, Akitsuki Y (2008) Who caused the pain? An fMRI investigation of empathy and intentionality in children. *Neuropsychologia* 46:2607–14
20. Levy J, Goldstein A, Pratt M, Feldman R (2018) Maturation of pain empathy from child to adult shifts from single to multiple neural rhythms to support interoceptive representations. *Sci Rep* 8:1810
21. Cheng Y, Chen C, Decety J (2014) An EEG/ERP investigation of the development of empathy in early and middle childhood. *Dev Cogn Neurosci* 10:160–9
22. van Houdt CA, Oosterlaan J, van Wassenaer-Leemhuis AG, et al (2019) Executive function deficits in children born preterm or at low birthweight: a meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 61:1015–24
23. Langerock N, van Hanswijck de Jonge L, Bickle Graz M, et al (2013) Emotional reactivity at 12 months in very preterm infants born at < 29 weeks of gestation. *Infant Behav Dev* 36:289–97
24. Witt A, Theurel A, Tolsa CB, et al (2014) Emotional and effortful control abilities in 42-month-old very preterm and full-term children. *Early Hum Dev* 90:565–9
25. Spittle AJ, Treyvaud K, Doyle LW, et al (2009) Early emergence of behavior and social-emotional problems in very preterm infants. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 48:909–18
26. Campbell C, Horlin C, Reid C, et al (2015) How do you think she feels? Vulnerability in empathy and the role of attention in school-aged children born extremely preterm. *Br J Dev Psychol* 33:312–23
27. Grimm S, Wirth K, Fan Y, et al (2017) The interaction of corticotropin-releasing hormone receptor gene and early life stress on emotional empathy. *Behav Brain Res* 329:180–5
28. Levy J, Goldstein A, Feldman R (2019) The neural development of empathy is sensitive to caregiving and early trauma. *Nat Commun* 10:1905
29. Ulmer Yaniv A, Salomon R, Waidergoren S, et al (2021) Synchronous caregiving from birth to adulthood tunes humans’ social brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118(14):e2012900118
30. Grunau RE, Whitfield MF, Petrie J (1998) Children’s judgements about pain at age 8–10 years: do extremely low birthweight ( $\leq 1\ 000$  g) children differ from full birthweight peers? *J Child Psychol Psychiatry* 39:587–94
31. Flasbeck V, Enzi B, Brune M (2019) Childhood trauma affects processing of social interactions in borderline personality disorder: an event-related potential study investigating empathy for pain. *World J Biol Psychiatry* 20:278–88
32. Xu X, Liu Z, Gong S, Wu Y (2022) The relationship between empathy and attachment in children and adolescents: three-level meta-analyses. *Int J Environ Res Public Health* 19(3):1391
33. Melchior M, Juif PE, Gazzo G, et al (2018) Pharmacological rescue of nociceptive hypersensitivity and oxytocin analgesia impairment in a rat model of neonatal maternal separation. *Pain* 159:2630–40
34. Gazzo G, Melchior M, Caussaint A, et al (2021) Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation. *Brain Behav Immun* 92:193–202
35. Barraza JA, Zak PJ (2009) Empathy toward strangers triggers oxytocin release and subsequent generosity. *Ann N Y Acad Sci* 1167:182–9
36. Hurlemann R, Patin A, Onur OA, et al (2010) Oxytocin enhances amygdala-dependent, socially reinforced learning and emotional empathy in humans. *J Neurosci* 30:4999–5007
37. Domes G, Heinrichs M, Michel A, et al (2007) Oxytocin improves “mind-reading” in humans. *Biol Psychiatry* 61:731–3
38. Rodrigues SM, Saslow LR, Garcia N, et al (2009) Oxytocin receptor genetic variation relates to empathy and stress reactivity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21437–41
39. Panksepp J, Panksepp JB (2013) Toward a cross-species understanding of empathy. *Trends Neurosci* 36:489–96
40. Hernandez-Lallement J, Gomez-Sotres P, Carrillo M (2022) Towards a unified theory of emotional contagion in rodents — A meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 132:1229–48
41. Church RM (1959) Emotional reactions of rats to the pain of others. *J Comp Physiol Psychol* 52:132–4
42. Li CL, Yu Y, He T, et al (2018) Validating rat model of empathy for pain: effects of pain expressions in social partners. *Front Behav Neurosci* 12:242
43. Langford DJ, Crager SE, Shehzad Z, et al (2006) Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science* 312:1967–70
44. Smith ML, Hostetler CM, Heinricher MM, Ryabinin AE (2016) Social transfer of pain in mice. *Sci Adv* 2:e1600855
45. Mogil JS (2015) Social modulation of and by pain in humans and rodents. *Pain* 156:S35–S41
46. Baptista-de-Souza D, Nunciato AC, Pereira BC, et al (2015) Mice undergoing neuropathic pain induce anxiogenic-like effects and hypernociception in cagemates. *Behav Pharmacol* 26:664–72
47. D’Amato FR (1997) Neurobiological and behavioral aspects of recognition in female mice. *Physiol Behav* 62:1311–7
48. Gioiosa L, Chiarotti F, Alleva E, Laviola G (2009) A trouble shared is a trouble halved: social context and status affect pain in mouse dyads. *PLoS One* 4:e4143
49. Smith ML, Asada N, Malenka RC (2021) Anterior cingulate inputs to nucleus accumbens control the social transfer of pain and analgesia. *Science* 371:153–9
50. Barroso AR, Araya EI, de Souza CP, et al (2019) Characterization of rat ultrasonic vocalization in the orofacial formalin test: influence of the social context. *Eur Neuropsychopharmacol* 29:1213–26
51. Melchior M, Kuhn P, Poisbeau P (2022) The burden of early life stress on the nociceptive system development and pain responses. *Eur J Neurosci* 55:2216–41
52. Kalamari A, Kentrop J, Hinna Danesi C, et al (2021) Complex housing, but not maternal deprivation affects motivation to

- liberate a trapped cage-mate in an operant rat task. *Front Behav Neurosci* 15:698501
53. Asadi E, Khodagholi F, Asadi S, et al (2021) Quality of early-life maternal care predicts empathy-like behavior in adult male rats: linking empathy to *BDNF* gene expression in associated brain regions. *Brain Res* 1767:147568
54. Lapp HE, Bartlett AA, Zup SL, et al (2020) Early experience alters developmental trajectory of central oxytocin systems involved in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation in Long-Evans rats. *Horm Behav* 126:104822
55. Kikusui T, Ishio Y, Nagasawa M, et al (2016) Early weaning impairs a social contagion of pain-related stretching behavior in mice. *Dev Psychobiol* 58:1101–7
56. Laviola G, Leonardo A, Ceci FM, Fiore M (2021) Callous unemotional trait-like mice and their stressed dams. *Psychoneuroendocrinology* 131:105296
57. Laviola G, Busdraghi LM, Meschino N, et al (2021) Aberrant early in life stimulation of the stress-response system affects emotional contagion and oxytocin regulation in adult male mice. *Int J Mol Sci* 22:5039

## VI. Bibliographie

- Abu-Akel, A., Palgi, S., Klein, E., Decety, J., & Shamay-Tsoory, S. (2015). Oxytocin increases empathy to pain when adopting the other- but not the self-perspective. *Social Neuroscience*, 10(1), 7-15. <https://doi.org/10.1080/17470919.2014.948637>
- Aguggia, J. P., Suárez, M. M., & Rivarola, M. A. (2013). Early maternal separation : Neurobehavioral consequences in mother rats. *Behavioural Brain Research*, 248, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.040>
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Rio, J., & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 32(3), 256-266. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.12.013>
- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., & Ramírez, M. J. (2008). Effects of maternal separation on hypothalamic–pituitary–adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience*, 154(4), 1218-1226. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.011>
- Allin, J. T., & Banks, E. M. (1972). Functional aspects of ultrasound production by infant albino rats (*Rattus norvegicus*). *Animal Behaviour*, 20(1), 175-185. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(72\)80189-1](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(72)80189-1)
- Altman, J., & Sudarshan, K. (1975). Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Animal Behaviour*, 23, 896-920. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(75\)90114-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(75)90114-1)
- Alves, R. L., Portugal, C. C., Summavielle, T., Barbosa, F., & Magalhães, A. (2020). Maternal separation effects on mother rodents' behaviour : A systematic review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 117, 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.09.008>
- Anand, K. J. S., & Hickey, P. R. (1987). Pain and Its Effects in the Human Neonate and Fetus. *New England Journal of Medicine*, 317(21), 1321-1329. <https://doi.org/10.1056/NEJM198711193172105>
- Anand, K. J. S., & Scalzo, F. M. (2000). Can Adverse Neonatal Experiences Alter Brain Development and Subsequent Behavior? *Biology of the Neonate*, 77(2), 69-82. <https://doi.org/10.1159/000014197>
- Antoniou, G., Lambour, E., Steele, J. D., & Colvin, L. A. (2023). The effect of adverse childhood experiences on chronic pain and major depression in adulthood : A systematic review and meta-analysis. *British Journal of Anaesthesia*, 130(6), 729-746. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2023.03.008>

- Aouad, M., Petit-Demoulière, N., Goumon, Y., & Poisbeau, P. (2014). Etifoxine stimulates allopregnanolone synthesis in the spinal cord to produce analgesia in experimental mononeuropathy. *European Journal of Pain*, 18(2), 258-268.  
<https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00367.x>
- Aylward, G. P. (2003). Cognitive Function in Preterm Infants : No Simple Answers. *JAMA*, 289(6), 752. <https://doi.org/10.1001/jama.289.6.752>
- Baccei, M. L., & Fitzgerald, M. (2004). Development of GABAergic and Glycinergic Transmission in the Neonatal Rat Dorsal Horn. *The Journal of Neuroscience*, 24(20), 4749-4757. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5211-03.2004>
- Baes, C. V. W., Martins, C. M. S., Tofoli, S. M. D. C., & Juruena, M. F. (2014). Early Life Stress in Depressive Patients : HPA Axis Response to GR and MR Agonist. *Frontiers in Psychiatry*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00002>
- Banqueri, M., Gutiérrez-Menéndez, A., Méndez, M., Conejo, N. M., & Arias, J. L. (2021). Early life stress due to repeated maternal separation alters the working memory acquisition brain functional network. *Stress*, 24(1), 87-95.  
<https://doi.org/10.1080/10253890.2020.1777974>
- Baptista-de-Souza, D., Nunciato, A. C., Pereira, B. C., Fachinni, G., Zaniboni, C. R., & Canto-de-Souza, A. (2015). Mice undergoing neuropathic pain induce anxiogenic-like effects and hypernociception in cagemates. *Behavioural Pharmacology*, 26(7), 664-672.  
<https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000170>
- Barker, D. J. P. (2004). The Developmental Origins of Adult Disease. *Journal of the American College of Nutrition*, 23(sup6), 588S-595S.  
<https://doi.org/10.1080/07315724.2004.10719428>
- Barraza, J. A., & Zak, P. J. (2009). Empathy toward Strangers Triggers Oxytocin Release and Subsequent Generosity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1167(1), 182-189. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04504.x>
- Barrot, M. (2012). Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>
- Bartocci, M., Bergqvist, L. L., Lagercrantz, H., & Anand, K. J. S. (2006). Pain activates cortical areas in the preterm newborn brain. *Pain*, 122(1-2), 109-117.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.01.015>
- Bartz, J. A., Nitschke, J. P., Krol, S. A., & Tellier, P.-P. (2019). Oxytocin Selectively Improves Empathic Accuracy : A Replication in Men and Novel Insights in Women. *Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging*, 4(12), 1042-1048.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpsc.2019.01.014>
- Bartz, J. A., Zaki, J., Bolger, N., Hollander, E., Ludwig, N. N., Kolevzon, A., & Ochsner, K. N. (2010). Oxytocin Selectively Improves Empathic Accuracy. *Psychological Science*, 21(10), 1426-1428. <https://doi.org/10.1177/0956797610383439>

- Bassey, R. B., Kalejaiye, O., Waller, B., Bamidele, I., & Gondré-Lewis, M. C. (2023). A 2-hit model of early life stress and later life restraint stress : Susceptibility or resilience to anxiety and alcohol drinking? *Current Research in Behavioral Sciences*, 5, 100118. <https://doi.org/10.1016/j.crbeha.2023.100118>
- Beggs, S., Torsney, C., Drew, L. J., & Fitzgerald, M. (2002). The postnatal reorganization of primary afferent input and dorsal horn cell receptive fields in the rat spinal cord is an activity-dependent process. *European Journal of Neuroscience*, 16(7), 1249-1258. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02185.x>
- Beland, B., & Fitzgerald, M. (2001). Mu- and delta-opioid receptors are downregulated in the largest diameter primary sensory neurons during postnatal development in rats. *Pain*, 90(1), 143-150. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(00\)00397-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(00)00397-3)
- Benbouzid, M., Pallage, V., Rajalu, M., Waltisperger, E., Doridot, S., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M. J., & Barrot, M. (2008). Sciatic nerve cuffing in mice : A model of sustained neuropathic pain. *European Journal of Pain*, 12(5), 591-599. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2007.10.002>
- Bennett, G. J., & Xie, Y.-K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1), 87-107. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90209-6](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90209-6)
- Benuzzi, F., Lui, F., Duzzi, D., Nichelli, P. F., & Porro, C. A. (2008). Does It Look Painful or Disgusting? Ask Your Parietal and Cingulate Cortex. *Journal of Neuroscience*, 28(4), 923-931. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4012-07.2008>
- Bernhardt, B. C., & Singer, T. (2012). The Neural Basis of Empathy. *Annual Review of Neuroscience*, 35(1), 1-23. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150536>
- Bethlehem, R. A. I., Baron-Cohen, S., Van Honk, J., Auyeung, B., & Bos, P. A. (2014). The oxytocin paradox. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00048>
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Agullana, R., & Weiss, S. M. (1991). Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiology & Behavior*, 50(5), 967-972. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(91\)90423-l](https://doi.org/10.1016/0031-9384(91)90423-l)
- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Rodgers, J., & Weiss, S. M. (1990). The characterization and modelling of antipredator defensive behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 14(4), 463-472. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(05\)80069-7](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(05)80069-7)
- Blanchard, R. J., Flannelly, K. J., & Blanchard, D. C. (1986). Defensive behavior of laboratory and wild *Rattus norvegicus*. *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 100(2), 101-107.
- Blumberg, M. S., & Alberts, J. R. (1990). Ultrasonic vocalizations by rat pups in the cold : An acoustic by-product of laryngeal braking? *Behavioral Neuroscience*, 104(5), 808-817. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.104.5.808>

- Blumberg, M. S., Sokoloff, G., & Kent, K. J. (2000). A developmental analysis of clonidine's effects on cardiac rate and ultrasound production in infant rats. *Developmental Psychobiology*, 36(3), 186-193. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(200004\)36:3<186::AID-DEV2>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(200004)36:3<186::AID-DEV2>3.0.CO;2-V)
- Bockhorst, K. h., Narayana, P. a., Liu, R., Ahobila-Vijjula, P., Ramu, J., Kamel, M., Wosik, J., Bockhorst, T., Hahn, K., Hasan, K. m., & Perez-Polo, J. r. (2008). Early postnatal development of rat brain : In vivo diffusion tensor imaging. *Journal of Neuroscience Research*, 86(7), 1520-1528. <https://doi.org/10.1002/jnr.21607>
- Borta, A., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. W. (2006). Rat ultrasonic vocalization in aversively motivated situations and the role of individual differences in anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research*, 166(2), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.08.009>
- Bouhassira, D., Lantéri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., & Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain*, 136(3), 380-387. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.08.013>
- Bravo, J. A., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014a). Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00024>
- Bravo, J. A., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2014b). Early-life stress induces persistent alterations in 5-HT1A receptor and serotonin transporter mRNA expression in the adult rat brain. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 7, 24. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00024>
- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., & Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe : Prevalence, impact on daily life, and treatment. *European Journal of Pain*, 10(4), 287-333. <https://doi.org/10.1016/j.ejpain.2005.06.009>
- Breton, J.-D., Veinante, P., Uhl-Bronner, S., Vergnano, A. M., Freund-Mercier, M. J., Schlichter, R., & Poisbeau, P. (2008). Oxytocin-induced antinociception in the spinal cord is mediated by a subpopulation of glutamatergic neurons in lamina I-II which amplify GABAergic inhibition. *Molecular Pain*, 4, 19. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-19>
- Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., & Vigouroux, M. (1992). Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat : Pups' anogenital licking. *Behavioural Brain Research*, 50(1), 147-154. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80296-7](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80296-7)
- Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission : Communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(3), 310-317. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.014>
- Brudzynski, S. M. (2015). Pharmacology of Ultrasonic Vocalizations in adult Rats : Significance, Call Classification and Neural Substrate. *Current Neuropharmacology*, 13(2), 180-192. <https://doi.org/10.2174/1570159X13999150210141444>

- Brudzynski, S. M. (2021). Biological Functions of Rat Ultrasonic Vocalizations, Arousal Mechanisms, and Call Initiation. *Brain Sciences*, 11(5), 605. <https://doi.org/10.3390/brainsci11050605>
- Brudzynski, S. M., & Fletcher, N. H. (2010). Rat ultrasonic vocalization : Short-range communication. In S. M. Brudzynski (Éd.), *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 19, p. 69-76). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374593-4.00008-5>
- Brudzynski, S. M., Kehoe, P., & Callahan, M. (1999). Sonographic structure of isolation-induced ultrasonic calls of rat pups. *Developmental Psychobiology*, 34(3), 195-204. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199904\)34:3<195::AID-DEV4>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199904)34:3<195::AID-DEV4>3.0.CO;2-S)
- Buck, C. L., Vendruscolo, L. F., Koob, G. F., & George, O. (2014). Dopamine D1 and  $\mu$ -opioid receptor antagonism blocks anticipatory 50 kHz ultrasonic vocalizations induced by palatable food cues in Wistar rats. *Psychopharmacology*, 231(5), 929-937. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3307-2>
- Burgdorf, J., Knutson, B., & Panksepp, J. (2000). Anticipation of rewarding electrical brain stimulation evokes ultrasonic vocalization in rats. *Behavioral Neuroscience*, 114(2), 320-327.
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfau, J. G., Brudzynski, S. M., & Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression : Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 122(4), 357-367. <https://doi.org/10.1037/a0012889>
- Burgdorf, J., Wood, P. L., Kroes, R. A., Moskal, J. R., & Panksepp, J. (2007). Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats : Electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behavioural Brain Research*, 182(2), 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.03.010>
- Burke, N. N., Finn, D. P., McGuire, B. E., & Roche, M. (2017). Psychological stress in early life as a predisposing factor for the development of chronic pain : Clinical and preclinical evidence and neurobiological mechanisms. *Journal of Neuroscience Research*, 95(6), 1257-1270. <https://doi.org/10.1002/jnr.23802>
- Burkett, J. P., Andari, E., Johnson, Z. V., Curry, D. C., de Waal, F. B. M., & Young, L. J. (2016). Oxytocin-dependent consolation behavior in rodents. *Science*, 351(6271), 375-378. <https://doi.org/10.1126/science.aac4785>
- Busby, E. R., & Sherwood, N. M. (2017). Gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) gene knock out : Normal growth and development of sensory, motor and spatial orientation behavior but altered metabolism in neonatal and prepubertal mice. *PLoS ONE*, 12(3), e0174452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174452>
- Bushnell, M. C., Čeko, M., & Low, L. A. (2013). Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(7), 502-511. <https://doi.org/10.1038/nrn3516>

- Butler, R. K., & Finn, D. P. (2009). Stress-induced analgesia. *Progress in Neurobiology*, 88(3), 184-202. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.003>
- Cameron, N. M., Soehngen, E., & Meaney, M. J. (2011). Variation in maternal care influences ventromedial hypothalamus activation in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(5), 393-400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02124.x>
- Campbell, C., Horlin, C., Reid, C., McMichael, J., Forrest, L., Brydges, C., French, N., & Anderson, M. (2015). How do you think she feels? Vulnerability in empathy and the role of attention in school-aged children born extremely preterm. *The British Journal of Developmental Psychology*, 33(3), 312-323. <https://doi.org/10.1111/bjdp.12091>
- Campbell, J. N., & Meyer, R. A. (2006). Mechanisms of Neuropathic Pain. *Neuron*, 52(1), 77-92. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.021>
- Carden, S. E., Bortot, A. T., & Hofer, M. A. (1993). Ultrasonic vocalizations are elicited from rat pups in the home cage by pentylenetetrazol and U50,488, but not naltrexone. *Behavioral Neuroscience*, 107(5), 851-859. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.107.5.851>
- Charles, M.-A., Delpierre, C., & Bréant, B. (2016). Le concept des origines développementales de la santé—Évolution sur trois décennies. *médecine/sciences*, 32(1), Article 1. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163201004>
- Chen, A., Chen, Y., Tang, Y., Bao, C., Cui, Z., Xiao, M., & Lin, C. (2017). Hippocampal AMPARs involve the central sensitization of rats with irritable bowel syndrome. *Brain and Behavior*, 7(3), e00650. <https://doi.org/10.1002/brb3.650>
- Chen, Y., & Baram, T. Z. (2016). Toward Understanding How Early-Life Stress Reprograms Cognitive and Emotional Brain Networks. *Neuropsychopharmacology*, 41(1), 197-206. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.181>
- Choy, V. J., & Watkins, W. B. (1979). Maturation of the hypothalamo-neurohypophyseal system : I. localization of neuropephsin, oxytocin and vasopressin in the hypothalamus and neural lobe of the developing rat brain. *Cell and Tissue Research*, 197(2). <https://doi.org/10.1007/BF00233923>
- Chung, E. K. Y., Zhang, X., Li, Z., Zhang, H., Xu, H., & Bian, Z. (2007). Neonatal maternal separation enhances central sensitivity to noxious colorectal distention in rat. *Brain Research*, 1153, 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.047>
- Church, R. M. (1959). Emotional reactions of rats to the pain of others. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 52(2), 132-134. <https://doi.org/10.1037/h0043531>
- Clayton, G. H., Owens, G. C., Wolff, J. S., & Roderic L. Smith. (1998). Ontogeny of cation-Cl<sup>-</sup> cotransporter expression in rat neocortex. *Developmental Brain Research*, 109(2), 281-292. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(98\)00078-9](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(98)00078-9)
- Collins, N. J., Campbell, T. S., Donoghue, K. M., Ghosh, U., Smith, J. N., O'Shea, M. C., Nelson, C. M., Bigham, O. K., & Roth, T. L. (2023). Early life stress and the role of

- environmental and molecular moderators in the ontology of pathological and resilient behavioral phenotypes. *Molecular Psychology: Brain, Behavior, and Society*, 1, 3. <https://doi.org/10.12688/molpsychol.17482.2>
- Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson, A. H., Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., & Raja, S. N. (2017). Neuropathic pain. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17002. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.2>
- Costa, A., Smeraldi, A., Tassorelli, C., Greco, R., & Nappi, G. (2005). Effects of acute and chronic restraint stress on nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *Neuroscience Letters*, 383(1-2), 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.03.026>
- Coutinho, S. V., Plotsky, P. M., Sablad, M., Miller, J. C., Zhou, H., Bayati, A. I., McRoberts, J. A., & Mayer, E. A. (2002). Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282(2), G307-16. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00240.2001>
- Couto-Pereira, N. de S., Ferreira, C. F., Lampert, C., Arcego, D. M., Tonizatto, A. P., Bernardi, J. R., da Silva, D. C., Von Poser Toigo, E., Diehl, L. A., Krolow, R., Silveira, P. P., & Dalmaz, C. (2016). Neonatal interventions differently affect maternal care quality and have sexually dimorphic developmental effects on corticosterone secretion. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 55, 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.10.001>
- Crane, J., Armson, A., Brunner, M., De La Ronde, S., Farine, D., Keenan-Lindsay, L., Leduc, L., Schneider, C., Van Aerde, J., & Executive Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. (2003). RETIRED : Antenatal corticosteroid therapy for fetal maturation. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC = Journal d'obstetrique et Gynecologie Du Canada: JOGC*, 25(1), 45-52. [https://doi.org/10.1016/s1701-2163\(16\)31081-7](https://doi.org/10.1016/s1701-2163(16)31081-7)
- Curé, M., & Rolinat, J. P. (1992). Behavioral heterogeneity in Sprague-Dawley rats. *Physiology & Behavior*, 51(4), 771-774. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90114-H](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90114-H)
- Danziger, N., Faillenot, I., & Peyron, R. (2009). Can we share a pain we never felt? Neural correlates of empathy in patients with congenital insensitivity to pain. *Neuron*, 61(2), 203-212. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.11.023>
- Davis, D. A., Luecken, L. J., & Zautra, A. J. (2005). Are Reports of Childhood Abuse Related to the Experience of Chronic Pain in Adulthood? : A Meta-analytic Review of the Literature. *The Clinical Journal of Pain*, 21(5), 398-405. <https://doi.org/10.1097/01.ajp.0000149795.08746.31>
- De Vignemont, F., & Singer, T. (2006). The empathic brain : How, when and why? *Trends in Cognitive Sciences*, 10(10), 435-441. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2006.08.008>

- Decety, J., Bartal, I. B.-A., Uzefovsky, F., & Knafo-Noam, A. (2016). Empathy as a driver of prosocial behaviour : Highly conserved neurobehavioural mechanisms across species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1686), 20150077. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0077>
- de Kort, A. R., Joosten, E. A. J., Patijn, J., Tibboel, D., & van den Hoogen, N. J. (2022). The development of descending serotonergic modulation of the spinal nociceptive network : A life span perspective. *Pediatric Research*, 91(6), 1361-1369. <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01638-9>
- Dhabhar, F. S., McEwen, B. S., & Spencer, R. L. (2008). Adaptation to Prolonged or Repeated Stress – Comparison between Rat Strains Showing Intrinsic Differences in Reactivity to Acute Stress. *Neuroendocrinology*, 65(5), 360-368. <https://doi.org/10.1159/000127196>
- Dielenberg, R. A., & McGregor, I. S. (2001). Defensive behavior in rats towards predatory odors : A review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25(7-8), 597-609. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(01\)00044-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(01)00044-6)
- Domes, G., Heinrichs, M., Michel, A., Berger, C., & Herpertz, S. C. (2007). Oxytocin Improves “Mind-Reading” in Humans. *Biological Psychiatry*, 61(6), 731-733. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.07.015>
- Downes, N., & Mullins, P. (2014). The Development of Myelin in the Brain of the Juvenile Rat. *Toxicologic Pathology*, 42(5), 913-922. <https://doi.org/10.1177/0192623313503518>
- Dutschmann, M., Mörschel, M., Rybak, I. A., & Dick, T. E. (2009). Learning to breathe : Control of the inspiratory–expiratory phase transition shifts from sensory- to central-dominated during postnatal development in rats. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 20), 4931-4948. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174599>
- Ellenbroek, B. A., Derkx, N., & Park, H.-J. (2009). Early maternal deprivation retards neurodevelopment in Wistar rats. *Stress*, 8(4), 247-257. <https://doi.org/10.1080/10253890500404634>
- Ennaceur, A., & Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1 : Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47-59. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(88\)90157-X](https://doi.org/10.1016/0166-4328(88)90157-X)
- Fabrizi, L., Slater, R., Worley, A., Meek, J., Boyd, S., Olhede, S., & Fitzgerald, M. (2011). A Shift in Sensory Processing that Enables the Developing Human Brain to Discriminate Touch from Pain. *Current Biology*, 21(18), 1552-1558. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.010>
- Fagundes, C. P., Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2013). Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. *Brain, Behavior, and Immunity*, 27, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2012.06.014>

- Faraday, M. M. (2002). Rat sex and strain differences in responses to stress. *Physiol Behav*, 75(4), 507-522. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00645-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00645-5)
- Faraday, M. M., Blakeman, K. H., & Grunberg, N. E. (2005). Strain and sex alter effects of stress and nicotine on feeding, body weight, and HPA axis hormones. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 80(4), 577-589. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.01.015>
- Farkas, J., Reglodi, D., Gaszner, B., Szogyi, D., Horvath, G., Lubics, A., Tamas, A., Frank, F., Besirevic, D., & Kiss, P. (2009). Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull*, 79(3-4), 208-214. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.12.011>
- Feather-Schussler, D. N., & Ferguson, T. S. (2016). A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. *J Vis Exp*, 117. <https://doi.org/10.3791/53569>
- Felitti, V. J., Anda, R. F., Nordenberg, D., Williamson, D. F., Spitz, A. M., Edwards, V., Koss, M. P., & Marks, J. S. (1998). Relationship of Childhood Abuse and Household Dysfunction to Many of the Leading Causes of Death in Adults : The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study. *American Journal of Preventive Medicine*, 14(4), 245-258. [https://doi.org/10.1016/S0749-3797\(98\)00017-8](https://doi.org/10.1016/S0749-3797(98)00017-8)
- File, S. E., & Hyde, J. R. (1978). Can social interaction be used to measure anxiety? *British Journal of Pharmacology*, 62(1), 19-24.
- Fitzgerald, M. (1988). The development of activity evoked by fine diameter cutaneous fibres in the spinal cord of the newborn rat. *Neuroscience Letters*, 86(2), 161-166. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(88\)90564-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(88)90564-2)
- Fitzgerald, M. (2005). The development of nociceptive circuits. *Nat Rev Neurosci*, 6(7), 507-520. <https://doi.org/10.1038/nrn1701>
- Fonseca-Rodrigues, D., Amorim, D., Almeida, A., & Pinto-Ribeiro, F. (2021). Emotional and cognitive impairments in the peripheral nerve chronic constriction injury model (CCI) of neuropathic pain : A systematic review. *Behav Brain Res*, 399, 113008. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.113008>
- Ford, Z. K., Dourson, A. J., Liu, X., Lu, P., Green, K. J., Hudgins, R. C., & Jankowski, M. P. (2019). Systemic growth hormone deficiency causes mechanical and thermal hypersensitivity during early postnatal development. *IBRO Reports*, 6, 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.02.001>
- Fuentes, I. M., & Christianson, J. A. (2018). The Influence of Early Life Experience on Visceral Pain. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2018.00002>
- Fuentes, I. M., Walker, N. K., Pierce, A. N., Holt, B. R., Di Silvestro, E. R., & Christianson, J. A. (2016). Neonatal maternal separation increases susceptibility to experimental colitis and acute stress exposure in male mice. *IBRO Reports*, 1, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.ibror.2016.07.001>

- Gardner, C. R. (1985). Distress vocalization in rat pups. A simple screening method for anxiolytic drugs. *Journal of Pharmacological Methods*, 14(3), 181-187. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(85\)90031-2](https://doi.org/10.1016/0160-5402(85)90031-2)
- Gazzo, G., Melchior, M., Caussaint, A., Gieré, C., Lelièvre, V., & Poisbeau, P. (2021a). Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 92, 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.010>
- Gazzo, G., Melchior, M., Caussaint, A., Gieré, C., Lelièvre, V., & Poisbeau, P. (2021b). Overexpression of chloride importer NKCC1 contributes to the sensory-affective and sociability phenotype of rats following neonatal maternal separation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 92, 193-202. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.010>
- Genty, J., Tetsi Nomigni, M., Anton, F., & Hanesch, U. (2018a). Maternal separation stress leads to resilience against neuropathic pain in adulthood. *Neurobiology of Stress*, 8, 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.11.002>
- Genty, J., Tetsi Nomigni, M., Anton, F., & Hanesch, U. (2018b). Neonatal maternal separation leads to a dampening of inflammation-related mechanical and thermal hypersensitivity in juvenile rats. *Neuroscience Letters*, 674, 117-122. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.03.044>
- Gerber, R. J., Wilks, T., & Erdie-Lalena, C. (2010). Developmental Milestones : Motor Development. *Pediatrics in Review*, 31(7), 267-277. <https://doi.org/10.1542/pir.31-7-267>
- Gieré, C., Menger, Y., Illouz, H., Melchior, M., Lelièvre, V., & Poisbeau, P. (2023). Towards a central origin of nociceptive hypersensitivity in adult rats after a neonatal maternal separation. *European Journal of Neuroscience*, 58(10), 4155-4165. <https://doi.org/10.1111/ejn.16170>
- Gieré, C., Thevenot, A., Menger, Y., Gazzo, G., & Poisbeau, P. (2022). Between Scylla and Charybdis : Assessing the multidimensional aspects of pain behaviors in rats using a double avoidance place preference paradigm. *PAIN*, 10.1097/j.pain.0000000000003383. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000003383>
- Godinho, F., Faillenot, I., Perchet, C., Frot, M., Magnin, M., & Garcia-Larrea, L. (2012). How the pain of others enhances our pain : Searching the cerebral correlates of « compassionate hyperalgesia ». *European Journal of Pain (London, England)*, 16(5), 748-759. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2011.00039.x>
- Gómez, F., Lahmame, A., de Kloet, R., & Armario, A. (2008). Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Response to Chronic Stress in Five Inbred Rat Strains : Differential Responses Are Mainly Located at the Adrenocortical Level. *Neuroendocrinology*, 63(4), 327-337. <https://doi.org/10.1159/000126973>

- Goubert, L., Craig, K. D., Vervoort, T., Morley, S., Sullivan, M. J. L., Williams, de C. A. C., Cano, A., & Crombez, G. (2005). Facing others in pain : The effects of empathy. *Pain*, 118(3), 285-288. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2005.10.025>
- Grégoire, S., Michaud, V., Chapuy, E., Eschalier, A., & Ardid, D. (2012). Study of emotional and cognitive impairments in mononeuropathic rats : Effect of duloxetine and gabapentin. *PAIN®*, 153(8), 1657-1663. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2012.04.023>
- Grimm, S., Wirth, K., Fan, Y., Weigand, A., Gärtner, M., Feeser, M., Dziobek, I., Bajbouj, M., & Aust, S. (2017). The interaction of corticotropin-releasing hormone receptor gene and early life stress on emotional empathy. *Behavioural Brain Research*, 329, 180-185. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.04.047>
- Grinevich, V., Desarménien, M. G., Chini, B., Tauber, M., & Muscatelli, F. (2015). Ontogenesis of oxytocin pathways in the mammalian brain : Late maturation and psychosocial disorders. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00164>
- Grunau, R. E., Holsti, L., & Peters, J. W. (2006). Long-term consequences of pain in human neonates. *Semin Fetal Neonatal Med*, 11(4), 268-275. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2006.02.007>
- Guastella, A. J., Einfeld, S. L., Gray, K. M., Rinehart, N. J., Tonge, B. J., Lambert, T. J., & Hickie, I. B. (2010). Intranasal Oxytocin Improves Emotion Recognition for Youth with Autism Spectrum Disorders. *Biological Psychiatry*, 67(7), 692-694. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.09.020>
- Hack, M., Flannery, D. J., Schluchter, M., Cartar, L., Borawski, E., & Klein, N. (2002). Outcomes in Young Adulthood for Very-Low-Birth-Weight Infants. *New England Journal of Medicine*, 346(3), 149-157. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010856>
- Hakamata, Y., Suzuki, Y., Kobashikawa, H., & Hori, H. (2022). Neurobiology of early life adversity : A systematic review of meta-analyses towards an integrative account of its neurobiological trajectories to mental disorders. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 65, 100994. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2022.100994>
- Halfon, N., & Hochstein, M. (2002). Life Course Health Development : An Integrated Framework for Developing Health, Policy, and Research. *The Milbank Quarterly*, 80(3), 433-479. <https://doi.org/10.1111/1468-0009.00019>
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., & Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *PAIN*, 32(1), 77. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(88\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0304-3959(88)90026-7)
- Harris, R. B. S., Zhou, J., Youngblood, B. D., Smagin, G. N., & Ryan, D. H. (1997). Failure to Change Exploration or Saccharin Preference In Rats Exposed to Chronic Mild Stress. *Physiology & Behavior*, 63(1), 91-100. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(97\)00425-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(97)00425-3)

- Hashimoto, H., Saito, T. R., Furudate, S., & Takahashi, K. W. (2001). Prolactin Levels and Maternal Behavior Induced by Ultrasonic Vocalizations of the Rat Pup. *Experimental Animals*, 50(4), 307-312. <https://doi.org/10.1538/expanim.50.307>
- Heim, C., Shugart, M., Craighead, W. E., & Nemeroff, C. B. (2010). Neurobiological and psychiatric consequences of child abuse and neglect. *Developmental Psychobiology*, 52(7), 671-690. <https://doi.org/10.1002/dev.20494>
- Heim, C., Young, L. J., Newport, D. J., Mletzko, T., Miller, A. H., & Nemeroff, C. B. (2009). Lower CSF oxytocin concentrations in women with a history of childhood abuse. *Molecular Psychiatry*, 14(10), 954-958. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.112>
- Hermann, C., Hohmeister, J., Demirakça, S., Zohsel, K., & Flor, H. (2006). Long-term alteration of pain sensitivity in school-aged children with early pain experiences. *Pain*, 125(3), 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.08.026>
- Hernandez-Lallement, J., Gómez-Sotres, P., & Carrillo, M. (2022). Towards a unified theory of emotional contagion in rodents—A meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 132, 1229-1248. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.09.010>
- Hestehave, S., Abelson, K. S. P., Brønnum Pedersen, T., Finn, D. P., Andersson, D. R., & Munro, G. (2020). The influence of rat strain on the development of neuropathic pain and comorbid anxiety-depressive behaviour after nerve injury. *Scientific Reports*, 10(1), 20981. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77640-8>
- Hestehave, S., Abelson, K. S. P., Brønnum Pedersen, T., & Munro, G. (2019a). The analgesic efficacy of morphine varies with rat strain and experimental pain model : Implications for target validation efforts in pain drug discovery. *European Journal of Pain*, 23(3), 539-554. <https://doi.org/10.1002/ejp.1327>
- Hestehave, S., Abelson, K. S. P., Brønnum Pedersen, T., & Munro, G. (2019b). Stress sensitivity and cutaneous sensory thresholds before and after neuropathic injury in various inbred and outbred rat strains. *Behavioural Brain Research*, 375, 112149. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112149>
- Heyser, C. J. (2003). Assessment of Developmental Milestones in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, 25(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0818s25>
- Hodgson, R. A., Guthrie, D. H., & Varty, G. B. (2008). Duration of ultrasonic vocalizations in the isolated rat pup as a behavioral measure : Sensitivity to anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 88(3), 341-348. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.09.005>
- Hofer, M. A. (1996). Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology*, 21(2), 203-217. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(95\)00042-9](https://doi.org/10.1016/0306-4530(95)00042-9)
- Hofer, M. A., Masmela, J. R., Brunelli, S. A., & Shair, H. N. (1998). The ontogeny of maternal potentiation of the infant rats' isolation call. *Developmental Psychobiology*, 33(3),

- 189-201. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199811\)33:3<189::AID-DEV1>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199811)33:3<189::AID-DEV1>3.0.CO;2-N)
- Hofer, M. A., Shair, H. N., & Brunelli, S. A. (2001). Ultrasonic Vocalizations in Rat and Mouse Pups. *Current Protocols in Neuroscience*, 17(1), 8.14.1-8.14.16. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0814s17>
- Hubbard, C. S., Khan, S. A., Xu, S., Cha, M., Masri, R., & Seminowicz, D. A. (2015). Behavioral, metabolic and functional brain changes in a rat model of chronic neuropathic pain : A longitudinal MRI study. *NeuroImage*, 107, 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.12.024>
- Hughes, K., Bellis, M. A., Hardcastle, K. A., Sethi, D., Butchart, A., Mikton, C., Jones, L., & Dunne, M. P. (2017). The effect of multiple adverse childhood experiences on health : A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Public Health*, 2(8), e356-e366. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(17\)30118-4](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(17)30118-4)
- Huot, R. (2004). Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology*, 29(2), 279-289. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(03\)00028-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(03)00028-3)
- Huot, R. L., Plotsky, P. M., Lenox, R. H., & McNamara, R. K. (2002). Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Research*, 950(1), 52-63. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)02985-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)02985-2)
- Huttenlocher, P. R., De Courten, C., Garey, L. J., & Van Der Loos, H. (1982). Synaptogenesis in human visual cortex—Evidence for synapse elimination during normal development. *Neuroscience Letters*, 33(3), 247-252. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90379-2](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90379-2)
- Illouz, H., Melchior, M., Lelièvre, V., & Poisbeau, P. (2023). Pain Hypersensitivity and Analgesia Deficits Induced by Neonatal Maternal Separation in Rats : Epigenetic Mechanisms Identification. *Douleur et analgésie*, 36(4), 264-280. <https://doi.org/10.3166/dea-2022-0277>
- Jaggi, A. S., Jain, V., & Singh, N. (2011). Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol*, 25(1), 1-28. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00801.x>
- Jennings, E., & Fitzgerald, M. (1998). Postnatal changes in responses of rat dorsal horn cells to afferent stimulation : A fibre-induced sensitization. *The Journal of Physiology*, 509(3), 859-868. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.859bm.x>
- Jourdan, D., Ardid, D., Chapuy, E., Eschalier, A., & Le Bars, D. (1995). Audible and ultrasonic vocalization elicited by single electrical nociceptive stimuli to the tail in the rat. *Pain*, 63(2), 237-249. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00049-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00049-X)
- Juif, P. E., Salio, C., Zell, V., Melchior, M., Lacaud, A., Petit-Demouliere, N., Ferrini, F., Darbon, P., Hanesch, U., Anton, F., Merighi, A., Lelievre, V., & Poisbeau, P. (2016). Peripheral and central alterations affecting spinal nociceptive processing and pain at adulthood in rats exposed to neonatal maternal deprivation. *Eur J Neurosci*, 44(3), 1952-1962. <https://doi.org/10.1111/ejn.13294>

- Juruena, M. F., Eror, F., Cleare, A. J., & Young, A. H. (2020). The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. In Y.-K. Kim (Ed.), *Anxiety Disorders* (Vol. 1191, p. 141-153). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0\\_9](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_9)
- Kahle, K. T., & Staley, K. J. (2008). The bumetanide-sensitive Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 as a potential target of a novel mechanism-based treatment strategy for neonatal seizures. *Neurosurgical Focus*, 25(3), E22. <https://doi.org/10.3171/FOC/2008/25/9/E22>
- Kalinichev, M., Easterling, K. W., & Holtzman, S. G. (2001). Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in morphine tolerance and dependence. *Psychopharmacology*, 157(3), 305-312. <https://doi.org/10.1007/s002130100806>
- Kalinichev, M., Easterling, K. W., Plotsky, P. M., & Holtzman, S. G. (2002). Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 73(1), 131-140. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(02\)00781-5](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(02)00781-5)
- Kalinichev, M., & Holtzman, S. G. (2003). Changes in Urination/Defecation, Auditory Startle Response, and Startle-Induced Ultrasonic Vocalizations in Rats Undergoing Morphine Withdrawal : Similarities and Differences between Acute and Chronic Dependence. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(2), 603-609. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.044206>
- Kaltwasser, M. T. (1990). Startle-inducing acoustic stimuli evoke ultrasonic vocalization in the rat. *Physiology & Behavior*, 48(1), 13-17. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90253-z](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90253-z)
- Kamoun, N., Gazzo, G., Goumon, Y., Andry, V., Yalcin, I., & Poisbeau, P. (2021). Long-lasting analgesic and neuroprotective action of the non-benzodiazepine anxiolytic etifoxine in a mouse model of neuropathic pain. *Neuropharmacology*, 182, 108407. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108407>
- Keller, A. F., Coull, J. A. M., Chéry, N., Poisbeau, P., & De Koninck, Y. (2001). Region-Specific Developmental Specialization of GABA-Glycine Cosynapses in Laminas I-II of the Rat Spinal Dorsal Horn. *The Journal of Neuroscience*, 21(20), 7871-7880. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-20-07871.2001>
- Kelly, J. B., & Masterton, B. (1977). Auditory sensitivity of the albino rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 91(4), 930-936. <https://doi.org/10.1037/h0077356>
- Keshavan, M. S., Diwadkar, V. A., DeBellis, M., Dick, E., Kotwal, R., Rosenberg, D. R., Sweeney, J. A., Minshew, N., & Pettegrew, J. W. (2002). Development of the corpus callosum in childhood, adolescence and early adulthood. *Life Sciences*, 70(16), 1909-1922. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)01492-3](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01492-3)

- Kikusui, T., Ishio, Y., Nagasawa, M., Mogil, J. S., & Mogi, K. (2016). Early weaning impairs a social contagion of pain-related stretching behavior in mice. *Developmental Psychobiology*, 58(8), 1101-1107. <https://doi.org/10.1002/dev.21443>
- Kikusui, T., & Mori, Y. (2009). Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(4), 427-431. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01837.x>
- Knapp, D. J., & Pohorecky, L. A. (1995). An air-puff stimulus method for elicitation of ultrasonic vocalizations in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 62(1-2), 1-5. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(95\)00044-5](https://doi.org/10.1016/0165-0270(95)00044-5)
- Knobloch, H. S., & Grinevich, V. (2014). Evolution of oxytocin pathways in the brain of vertebrates. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 31. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00031>
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (1998). Anticipation of play elicits high-frequency ultrasonic vocalizations in young rats. *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 112(1), 65-73. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.112.1.65>
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (1999). High-frequency ultrasonic vocalizations index conditioned pharmacological reward in rats. *Physiology & Behavior*, 66(4), 639-643. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00337-0](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00337-0)
- Knutson, B., Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2002). Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychological Bulletin*, 128(6), 961-977. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.128.6.961>
- Koe, A. S., Ashokan, A., & Mitra, R. (2016). Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. *Translational Psychiatry*, 6(2), e729. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.217>
- Kogler, L., Müller, V. I., Werminghausen, E., Eickhoff, S. B., & Derntl, B. (2020). Do I feel or do I know? Neuroimaging meta-analyses on the multiple facets of empathy. *Cortex*, 129, 341-355. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2020.04.031>
- Kontinen, V. K., Kauppila, T., Paananen, S., Pertovaara, A., & Kalso, E. (1999). Behavioural measures of depression and anxiety in rats with spinal nerve ligation-induced neuropathy. *PAIN*, 80(1), 341. [https://doi.org/10.1016/S0304-3959\(98\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S0304-3959(98)00230-9)
- Kosfeld, M., Heinrichs, M., Zak, P. J., Fischbacher, U., & Fehr, E. (2005). Oxytocin increases trust in humans. *Nature*, 435(7042), 673-676. <https://doi.org/10.1038/nature03701>
- Kremer, M., Becker, L. J., Barrot, M., & Yalcin, I. (2021). How to study anxiety and depression in rodent models of chronic pain? *European Journal of Neuroscience*, 53(1), 236-270. <https://doi.org/10.1111/ejn.14686>
- Kuhlman, K. R. (2024). Pitfalls and potential : Translating the two-hit model of early life stress from pre-clinical non-human experiments to human samples. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 35, 100711. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2023.100711>

- Kuhn, C. M., & Schanberg, S. M. (1998). Responses to maternal separation : Mechanisms and mediators. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 16(3-4), 261-270. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(98\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(98)00034-3)
- Kwok, C. H. T., Devonshire, I. M., Bennett, A. J., & Hathway, G. J. (2014). Postnatal maturation of endogenous opioid systems within the periaqueductal grey and spinal dorsal horn of the rat. *Pain*, 155(1), 168-178. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.09.022>
- Ladd, C. O., Huot, R. L., Thrivikraman, K. V., Nemeroff, C. B., & Plotsky, P. M. (2004). Long-term adaptations in glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor mRNA and negative feedback on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis following neonatal maternal separation. *Biological Psychiatry*, 55(4), 367-375. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.007>
- Lamm, C., Decety, J., & Singer, T. (2011). Meta-analytic evidence for common and distinct neural networks associated with directly experienced pain and empathy for pain. *NeuroImage*, 54(3), 2492-2502. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.10.014>
- Langford, D. J., Crager, S. E., Shehzad, Z., Smith, S. B., Sotocinal, S. G., Levenstadt, J. S., Chanda, M. L., Levitin, D. J., & Mogil, J. S. (2006). Social Modulation of Pain as Evidence for Empathy in Mice. *Science*, 312(5782), 1967-1970. <https://doi.org/10.1126/science.1128322>
- Lapp, H. E., Bartlett, A. A., Zup, S. L., Hunter, R. G., & Moore, C. L. (2020). Early experience alters developmental trajectory of central oxytocin systems involved in hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation in Long-Evans rats. *Hormones and Behavior*, 126, 104822. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104822>
- Lariviere, W. R., & Mogil, J. S. (2010). The Genetics of Pain and Analgesia in Laboratory Animals. In A. Szallasi (Ed.), *Analgesia : Methods and Protocols* (p. 261-278). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-323-7\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-323-7_20)
- Laviola, G., Busdraghi, L. M., Meschino, N., Petrella, C., & Fiore, M. (2021). Aberrant Early in Life Stimulation of the Stress-Response System Affects Emotional Contagion and Oxytocin Regulation in Adult Male Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms22095039>
- Lee, H.-J., Macbeth, A. H., Pagani, J., & Young, W. S. (2009). Oxytocin : The Great Facilitator of Life. *Progress in Neurobiology*, S030100820900046X. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.04.001>
- Li, C. L., Yu, Y., He, T., Wang, R. R., Geng, K. W., Du, R., Luo, W. J., Wei, N., Wang, X. L., Wang, Y., Yang, Y., Yu, Y. Q., & Chen, J. (2018). Validating Rat Model of Empathy for Pain : Effects of Pain Expressions in Social Partners. *Front Behav Neurosci*, 12, 242. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00242>
- Li, H., Tornberg, J., Kaila, K., Airaksinen, M. S., & Rivera, C. (2002). Patterns of cation-chloride cotransporter expression during embryonic rodent CNS development. *European*

- Journal of Neuroscience*, 16(12), 2358-2370. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02419.x>
- Li, K., & Xu, E. (2008). The role and the mechanism of  $\gamma$ -aminobutyric acid during central nervous system development. *Neuroscience Bulletin*, 24(3), 195-200. <https://doi.org/10.1007/s12264-008-0109-3>
- Li, X., Liu, Y., Ye, Q., Lu, X., & Peng, W. (2020). The linkage between first-hand pain sensitivity and empathy for others' pain : Attention matters. *Human Brain Mapping*, 41(17), 4815-4828. <https://doi.org/10.1002/hbm.25160>
- Li, Z., Lu, Y.-F., Li, C.-L., Wang, Y., Sun, W., He, T., Chen, X.-F., Wang, X.-L., & Chen, J. (2014). Social interaction with a cagemate in pain facilitates subsequent spinal nociception via activation of the medial prefrontal cortex in rats. *PAIN*, 155(7), 1253-1261. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.03.019>
- Lijffijt, M., Hu, K., & Swann, A. C. (2014). Stress Modulates Illness-Course of Substance Use Disorders : A Translational Review. *Frontiers in Psychiatry*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00083>
- Litvin, Y., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (2007). Rat 22kHz ultrasonic vocalizations as alarm cries. *Behavioural Brain Research*, 182(2), 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.038>
- Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (2000). Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(1), 5-12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00422.x>
- Lu, Y. F., Ren, B., Ling, B. F., Zhang, J., Xu, C., & Li, Z. (2018). Social interaction with a cagemate in pain increases allogrooming and induces pain hypersensitivity in the observer rats. *Neurosci Lett*, 662, 385-388. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.10.063>
- Luis-Delgado, O. E., Barrot, M., Rodeau, J. L., Schott, G., Benbouzid, M., Poisbeau, P., Freund-Mercier, M. J., & Lasbennes, F. (2006). Calibrated forceps : A sensitive and reliable tool for pain and analgesia studies. *J Pain*, 7(1), 32-39. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2005.07.011>
- Luo, J.-L., Qin, H.-Y., Wong, C.-K., Tsang, S.-Y., Huang, Y., & Bian, Z.-X. (2011). Enhanced Excitability and Down-Regulated Voltage-Gated Potassium Channels in Colonic DRG Neurons from Neonatal Maternal Separation Rats. *The Journal of Pain*, 12(5), 600-609. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.11.005>
- Luo, W.-J., Li, C.-L., Geng, K.-W., Wang, X.-L., Du, R., Yu, Y., Wei, N., He, T., Wang, Y., Yu, Y.-Q., & Chen, J. (2020). The similar past pain experience evokes both observational contagious pain and consolation in stranger rat observers. *Neuroscience Letters*, 722, 134840. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134840>

- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434-445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- Maatta, J., Martikainen, A., Pakarinen, M., Ikaheimo, T.-M., Nissen, M., von Und Zu Fraunberg, M., Viinamaki, H., & Huttunen, J. (2019). High Level of Childhood Trauma Predicts a Poor Response to Spinal Cord Stimulation in Chronic Neuropathic Pain. *Pain Physician*, 22(1), E37-E44.
- Macrì, S., Zoratto, F., & Laviola, G. (2011). Early-stress regulates resilience, vulnerability and experimental validity in laboratory rodents through mother–offspring hormonal transfer. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(7), 1534-1543. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.12.014>
- Mainka, T., Balint, B., Gövert, F., Kurvits, L., van Riesen, C., Kühn, A. A., Tijssen, M. A. J., Lees, A. J., Müller-Vahl, K., Bhatia, K. P., & Ganos, C. (2019). The spectrum of involuntary vocalizations in humans : A video atlas. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 34(12), 1774-1791. <https://doi.org/10.1002/mds.27855>
- Mandelli, L., Petrelli, C., & Serretti, A. (2015). The role of specific early trauma in adult depression : A meta-analysis of published literature. Childhood trauma and adult depression. *European Psychiatry: The Journal of the Association of European Psychiatrists*, 30(6), 665-680. <https://doi.org/10.1016/j.eurpsy.2015.04.007>
- Manduca, A., Campolongo, P., Palmery, M., Vanderschuren, L. J. M. J., Cuomo, V., & Trezza, V. (2014). Social play behavior, ultrasonic vocalizations and their modulation by morphine and amphetamine in Wistar and Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology*, 231(8), 1661-1673. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3337-9>
- Mao, H., & Ding, L. (2019). Downregulation of miR-21 suppresses 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neuronal damage in MES23.5 cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 18(4), 2467-2474. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7853>
- Martin, L. J., Hathaway, G., Isbester, K., Mirali, S., Acland, E. L., Niederstrasser, N., Slepian, P. M., Trost, Z., Bartz, J. A., Sapsky, R. M., Sternberg, W. F., Levitin, D. J., & Mogil, J. S. (2015). Reducing Social Stress Elicits Emotional Contagion of Pain in Mouse and Human Strangers. *Current Biology*, 25(3), 326-332. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.028>
- Martins, I., Carvalho, P., de Vries, M. G., Teixeira-Pinto, A., Wilson, S. P., Westerink, B. H. C., & Tavares, I. (2015). Increased Noradrenergic Neurotransmission to a Pain Facilitatory Area of the Brain Is Implicated in Facilitation of Chronic Pain. *Anesthesiology*, 123(3), 642-653. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000749>
- Masrour, F. F., Peeri, M., Azarbayjani, M. A., & Hosseini, M.-J. (2018). Voluntary Exercise During Adolescence Mitigated Negative the Effects of Maternal Separation Stress on the Depressive-Like Behaviors of Adult Male Rats : Role of NMDA Receptors.

- Neurochemical Research*, 43(5), 1067-1074. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2519-6>
- McEwen, B. S. (2006). Protective and damaging effects of stress mediators : Central role of the brain. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(4), 367-381.  
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2006.8.4/bmcewen>
- McEwen, B. S. (2008). Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. *Metabolism*, 57, S11-S15.  
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.07.006>
- McEwen, B. S. (2020). The untapped power of allostasis promoted by healthy lifestyles. *World Psychiatry*, 19(1), 57. <https://doi.org/10.1002/wps.20720>
- McEwen, B. S., & Akil, H. (2020). Revisiting the Stress Concept : Implications for Affective Disorders. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 40(1), 12-21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0733-19.2019>
- McIntosh, J., Anisman, H., & Merali, Z. (1999). Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats : Gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res*, 113(1-2), 97-106. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(99\)00005-x](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(99)00005-x)
- McIntosh, T. K., & Barfield, R. J. (1980). The temporal patterning of 40–60 kHz ultrasonic vocalizations and copulation in the rat (*Rattus norvegicus*). *Behavioral & Neural Biology*, 29(3), 349-358. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(80\)90259-9](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(80)90259-9)
- McIntosh, T. K., Barfield, R. J., & Geyer, L. A. (1978). Ultrasonic vocalisations facilitate sexual behaviour of female rats. *Nature*, 272(5649), 163-164.  
<https://doi.org/10.1038/272163a0>
- McLaughlin, K. A., Weissman, D., & Bitran, D. (2019). Childhood Adversity and Neural Development : A Systematic Review. *Annu Rev Dev Psychol*, 1, 277-312.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-devpsych-121318-084950>
- Meaney, M. J., Bhatnagar, S., Larocque, S., McCormick, C., Shanks, N., Sharma, S., Smythe, J., Viau, V., & Plotsky, P. M. (1993). Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Ann N Y Acad Sci*, 697, 70-85. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb49924.x>
- Melchior, M., Juif, P. E., Gazzo, G., Petit-Demouliere, N., Chavant, V., Lacaud, A., Goumon, Y., Charlet, A., Lelievre, V., & Poisbeau, P. (2018). Pharmacological rescue of nociceptive hypersensitivity and oxytocin analgesia impairment in a rat model of neonatal maternal separation. *Pain*, 159(12), 2630-2640.  
<https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001375>
- Melchior, M., Kuhn, P., & Poisbeau, P. (2021). The burden of early life stress on the nociceptive system development and pain responses. *Eur J Neurosci*.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.15153>

- Melchior, M., & Poisbeau, P. (2015). Conséquences des perturbations périnatales sur les réponses douloureuses. *Douleurs : Evaluation - Diagnostic - Traitement*, 16(2), 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.douler.2015.02.007>
- Menard, J. L., Champagne, D. L., & Meaney, M. J. P. (2004). Variations of maternal care differentially influence « fear » reactivity and regional patterns of cFos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. *Neuroscience*, 129(2), 297-308. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.08.009>
- Mesquita, A. R., Pego, J. M., Summaville, T., Maciel, P., Almeida, O. F., & Sousa, N. (2007). Neurodevelopment milestone abnormalities in rats exposed to stress in early life. *Neuroscience*, 147(4), 1022-1033. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.04.007>
- Miki, T., Yokoyama, T., Kusaka, T., Suzuki, S., Ohta, K., Warita, K., Wang, Z. Y., Ueki, M., Sumitani, K., Bellinger, F. P., Tamai, M., Liu, J. Q., Yakura, T., & Takeuchi, Y. (2014). Early postnatal repeated maternal deprivation causes a transient increase in OMpg and BDNF in rat cerebellum suggesting precocious myelination. *J Neurol Sci*, 336(1-2), 62-67. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.10.007>
- Miller, G. E., Chen, E., & Parker, K. J. (2011). Psychological stress in childhood and susceptibility to the chronic diseases of aging : Moving toward a model of behavioral and biological mechanisms. *Psychological Bulletin*, 137(6), 959-997. <https://doi.org/10.1037/a0024768>
- Mizoguchi, H., Fukumoto, K., Sakamoto, G., Jin, S., Toyama, A., Wang, T., Suzumura, A., & Sato, J. (2019). Maternal separation as a risk factor for aggravation of neuropathic pain in later life in mice. *Behavioural Brain Research*, 359, 942-949. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.06.015>
- Modi, A. D., Parekh, A., & Pancholi, Y. N. (2023). Evaluating pain behaviours : Widely used mechanical and thermal methods in rodents. *Behavioural Brain Research*, 446, 114417. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2023.114417>
- Moloney, R. D., Stilling, R. M., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Early-life stress-induced visceral hypersensitivity and anxiety behavior is reversed by histone deacetylase inhibition. *Neurogastroenterology and Motility*, 27(12), 1831-1836. <https://doi.org/10.1111/nmo.12675>
- Monk, C. S., Webb, S. J., & Nelson, C. A. (2001). Prenatal Neurobiological Development : Molecular Mechanisms and Anatomical Change. *Developmental Neuropsychology*, 19(2), 211-236. [https://doi.org/10.1207/S15326942DN1902\\_5](https://doi.org/10.1207/S15326942DN1902_5)
- Monroy, E., Hernández-Torres, E., & Flores, G. (2010). Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 40(2), 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2010.05.005>

- Mosconi, T., & Kruger, L. (1996). Fixed-diameter polyethylene cuffs applied to the rat sciatic nerve induce a painful neuropathy : Ultrastructural morphometric analysis of axonal alterations. *Pain*, 64(1), 37-57. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(95)00077-1)
- Moster, D., Lie, R. T., & Markestad, T. (2008). Long-term medical and social consequences of preterm birth. *The New England Journal of Medicine*, 359(3), 262-273. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706475>
- Murthy, S., & Gould, E. (2018). Early Life Stress in Rodents : Animal Models of Illness or Resilience? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00157>
- Mutschler, N. H., & Miczek, K. A. (1998). Withdrawal from a self-administered or non-contingent cocaine binge : Differences in ultrasonic distress vocalizations in rats. *Psychopharmacology*, 136(4), 402-408. <https://doi.org/10.1007/s002130050584>
- Nakamoto, K., Taniguchi, A., & Tokuyama, S. (2020). Changes in opioid receptors, opioid peptides and morphine antinociception in mice subjected to early life stress. *Eur J Pharmacol*, 881, 173173. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173173>
- Nazeri, M., Nezhadi, A., & Shabani, M. (2019). Role of Opioid System in Empathy-like Behaviours in Rats. *Addiction & Health*, 11(4), 216. <https://doi.org/10.22122/ahj.v11i4.243>
- Newman, J. D. (2007). Neural circuits underlying crying and cry responding in mammals. *Behavioural Brain Research*, 182(2), 155-165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.02.011>
- Nguyen, A. T., Armstrong, E. A., & Yager, J. Y. (2017). Neurodevelopmental Reflex Testing in Neonatal Rat Pups. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 122, 55261. <https://doi.org/10.3791/55261>
- Nishinaka, T., Nakamoto, K., & Tokuyama, S. (2015). Enhancement of nerve-injury-induced thermal and mechanical hypersensitivity in adult male and female mice following early life stress. *Life Sciences*, 121, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.012>
- Nitschke, W. (1982). *Acoustic Behavior in the Rat. Research, Theory, and Applications*. Praeger Publishers.
- Noirot, E. (1968). Ultrasounds in young rodents. II. Changes with age in albino rats. *Animal Behaviour*, 16(1), 129-134. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(68\)90123-1](https://doi.org/10.1016/0003-3472(68)90123-1)
- Ohta, K.-I., Miki, T., Warita, K., Suzuki, S., Kusaka, T., Yakura, T., Liu, J.-Q., Tamai, M., & Takeuchi, Y. (2014). Prolonged maternal separation disturbs the serotonergic system during early brain development. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 33, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.10.007>
- Okun, A., McKinzie, D. L., Witkin, J. M., Remeniuk, B., Husein, O., Gleason, S. D., Oyarzo, J., Navratilova, E., McElroy, B., Cowen, S., Kennedy, J. D., & Porreca, F. (2016). Hedonic

- and motivational responses to food reward are unchanged in rats with neuropathic pain. *PAIN*, 157(12), 2731. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000695>
- Olivier, B., Molewijk, E., van Oorschot, R., van der Heyden, J., Ronken, E., & Mos, J. (1998). Rat pup ultrasonic vocalization : Effects of benzodiazepine receptor ligands. *European Journal of Pharmacology*, 358(2), 117-128. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00603-7](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00603-7)
- O'Malley, D., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2011). Neonatal maternal separation in the rat impacts on the stress responsivity of central corticotropin-releasing factor receptors in adulthood. *Psychopharmacology*, 214(1), 221-229. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-1885-9>
- Organisation mondiale de la santé. (s. d.). *Maladies non transmissibles*. Consulté 23 juillet 2024, à l'adresse <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases>
- Orso, R., Creutzberg, K. C., Wearick-Silva, L. E., Wendt Viola, T., Trachtenberg, S. G., Benetti, F., & Grassi-Oliveira, R. (2019). How Early Life Stress Impact Maternal Care : A Systematic Review of Rodent Studies. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnbeh.2019.00197>
- Oswalt, G. L., & Meier, G. W. (1975). Olfactory, thermal, and tactual influences on infantile ultrasonic vocalization in rats. *Developmental Psychobiology*, 8(2), 129-135. <https://doi.org/10.1002/dev.420080205>
- Panksepp, J. B., & Lahvis, G. P. (2011). Rodent empathy and affective neuroscience. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(9), 1864-1875. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.05.013>
- Panksepp, J., & Panksepp, J. B. (2013). Toward a cross-species understanding of empathy. *Trends Neurosci*, 36(8), 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.009>
- Pierce, A. N., Di Silvestro, E. R., Eller, O. C., Wang, R., Ryals, J. M., & Christianson, J. A. (2016). Urinary bladder hypersensitivity and dysfunction in female mice following early life and adult stress. *Brain Research*, 1639, 58-73. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.039>
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res*, 18(3), 195-200. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(93\)90189-v](https://doi.org/10.1016/0169-328x(93)90189-v)
- Portfors, C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 46(1), 28-34.
- Pradhan, N., Arunasmitha, S., & Udaya, H. B. (1990). Behavioral and neurochemical differences in an inbred strain of rats. *Physiology & Behavior*, 47(4), 705-708. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90081-E](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90081-E)

- Preston, S. D., & de Waal, F. B. (2002). Empathy : Its ultimate and proximate bases. *Behav Brain Sci*, 25(1), 1-20; discussion 20-71. <https://doi.org/10.1017/s0140525x02000018>
- Prusator, D. K., & Greenwood-Van Meerveld, B. (2016). Sex-related differences in pain behaviors following three early life stress paradigms. *Biology of Sex Differences*, 7, 29. <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0082-x>
- Qin, L., Tu, W., Sun, X., Zhang, J., Chen, Y., & Zhao, H. (2011). Retardation of neurobehavioral development and reelin down-regulation regulated by further DNA methylation in the hippocampus of the rat pups are associated with maternal deprivation. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 142-147. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.10.018>
- Rainville, P., Duncan, G. H., Price, D. D., Carrier, B., & Bushnell, M. C. (1997). Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5328), 968-971. <https://doi.org/10.1126/science.277.5328.968>
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X.-J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain : Concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976-1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>
- Rajaofetra, N., Poulat, P., Marlier, L., Geffard, M., & Privat, A. (1992). Pre- and postnatal development of noradrenergic projections to the rat spinal cord : An immunocytochemical study. *Developmental Brain Research*, 67(2), 237-246. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(92\)90224-K](https://doi.org/10.1016/0165-3806(92)90224-K)
- Reshetnikov, V. V., Kovner, A. V., Lepeshko, A. A., Pavlov, K. S., Grinkevich, L. N., & Bondar, N. P. (2020). Stress early in life leads to cognitive impairments, reduced numbers of CA3 neurons and altered maternal behavior in adult female mice. *Genes, Brain and Behavior*, 19(3), e12541. <https://doi.org/10.1111/gbb.12541>
- Rex, A., Voigt, J.-P., Gustedt, C., Beckett, S., & Fink, H. (2004). Anxiolytic-like profile in Wistar, but not Sprague-Dawley rats in the social interaction test. *Psychopharmacology*, 177(1-2), 23-34. <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1914-7>
- Rice, D., & Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system : Evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, 108(suppl 3), 511-533. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>
- Riede, T. (2013). Stereotypic laryngeal and respiratory motor patterns generate different call types in rat ultrasound vocalization. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 319(4), 213-224. <https://doi.org/10.1002/jez.1785>
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J. A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., & Kaila, K. (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing

- during neuronal maturation. *Nature*, 397(6716), 251-255. <https://doi.org/10.1038/16697>
- Roberts, L. H. (1975). Evidence for the laryngeal source of ultrasonic and audible cries of rodents. *Journal of Zoology*, 175(2), 243-257. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1975.tb01399.x>
- Romijn, H. J., Hofman, M. A., & Gramsbergen, A. (1991). At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Human Development*, 26(1), 61-67. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(91\)90044-4](https://doi.org/10.1016/0378-3782(91)90044-4)
- Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., & Torner, L. (2016). Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain, Behavior, and Immunity*, 55, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.017>
- Ross, C. A. (2005). Childhood Sexual Abuse and Psychosomatic Symptoms in Irritable Bowel Syndrome. *Journal of Child Sexual Abuse*, 14(1), 27-38. [https://doi.org/10.1300/J070v14n01\\_02](https://doi.org/10.1300/J070v14n01_02)
- Ross, H. E., & Young, L. J. (2009). Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(4), 534-547. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.004>
- Sakai, A., Saitow, F., Miyake, N., Miyake, K., Shimada, T., & Suzuki, H. (2013). miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain*, 136(9), 2738-2750. <https://doi.org/10.1093/brain/awt191>
- Sakai, A., & Suzuki, H. (2015). microRNA and Pain. In G. Santulli (Éd.), *microRNA: Medical Evidence : From Molecular Biology to Clinical Practice* (p. 17-39). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-22671-2_3)
- Sansone, R. A., Watts, D. A., & Wiederman, M. W. (2013). Childhood trauma and pain and pain catastrophizing in adulthood : A cross-sectional survey study. *The Primary Care Companion for CNS Disorders*, 15(4), PCC.13m01506. <https://doi.org/10.4088/PCC.13m01506>
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., & Hen, R. (2003). Requirement of Hippocampal Neurogenesis for the Behavioral Effects of Antidepressants. *Science*, 301(5634), 805-809. <https://doi.org/10.1126/science.1083328>
- Sarrieau, A., Chaouloff, F., Lemaire, V., & Mormède, P. (1998). Comparison of the neuroendocrine responses to stress in outbred, inbred and F1 hybrid rats. *Life Sciences*, 63(2), 87-96. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00243-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00243-4)
- Scharf, R. J., Scharf, G. J., & Stroustrup, A. (2016). Developmental Milestones. *Pediatrics In Review*, 37(1), 25-38. <https://doi.org/10.1542/pir.2014-0103>

- Schroeder, H., Humbert, A. C., Koziel, V., Desor, D., & Nehlig, A. (1995). Behavioral and metabolic consequences of neonatal exposure to diazepam in rat pups. *Experimental Neurology*, 131(1), 53-63. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(95\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(95)90007-1)
- Schwaller, F., & Fitzgerald, M. (2014). The consequences of pain in early life : Injury-induced plasticity in developing pain pathways. *The European Journal of Neuroscience*, 39(3), 344-352. <https://doi.org/10.1111/ejn.12414>
- Schwaller, F., Kwok, C., & Fitzgerald, M. (2016). Postnatal maturation of the spinal-bulbo-spinal loop : Brainstem control of spinal nociception is independent of sensory input in neonatal rats. *Pain*, 157(3), 677-686. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000420>
- Schwarting, R. K. W. (2018). Ultrasonic vocalization in female rats : A comparison among three outbred stocks from pups to adults. *Physiol Behav*, 196, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.08.009>
- Schwarting, R. K. W. (2023). Behavioral analysis in laboratory rats : Challenges and usefulness of 50-kHz ultrasonic vocalizations. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 152, 105260. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105260>
- Schwarting, R. K. W., & Wöhr, M. (2012). On the relationships between ultrasonic calling and anxiety-related behavior in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 45(4), 337-348. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500038>
- Schwarting, R. K. W., & Wöhr, M. (2018). Isolation-induced ultrasonic vocalizations in pups : A comparison between Long-Evans, Sprague-Dawley, and Wistar rats. *Dev Psychobiol*, 60(5), 534-543. <https://doi.org/10.1002/dev.21738>
- Scott, K. M., Smith, D. R., & Ellis, P. M. (2010). Prospectively Ascertained Child Maltreatment and Its Association With DSM-IV Mental Disorders in Young Adults. *Archives of General Psychiatry*, 67(7), 712. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.71>
- Selye, H. (1998). A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 10(2), 230-231. <https://doi.org/10.1176/jnp.10.2.230a>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans : Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, 106-107, 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- Shu, C., Xiao, L., Tang, J., Wang, G., Zhang, X., & Wang, X. (2015). Blunted behavioral and molecular responses to chronic mild stress in adult rats with experience of infancy maternal separation. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 235(2), 81-87. <https://doi.org/10.1620/tjem.235.81>

- Singer, T., & Lamm, C. (2009). The social neuroscience of empathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1156, 81-96. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04418.x>
- Singer, T., Seymour, B., O'Doherty, J., Kaube, H., Dolan, R. J., & Frith, C. D. (2004). Empathy for pain involves the affective but not sensory components of pain. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5661), 1157-1162. <https://doi.org/10.1126/science.1093535>
- Singer, T., Snozzi, R., Bird, G., Petrovic, P., Silani, G., Heinrichs, M., & Dolan, R. J. (2008). Effects of oxytocin and prosocial behavior on brain responses to direct and vicariously experienced pain. *Emotion*, 8(6), 781-791. <https://doi.org/10.1037/a0014195>
- Sinner, B., Becke, K., & Engelhard, K. (2014). General anaesthetics and the developing brain : An overview. *Anaesthesia*, 69(9), 1009-1022. <https://doi.org/10.1111/anae.12637>
- Sirotin, Y. B., Costa, M. E., & Laplagne, D. A. (2014). Rodent ultrasonic vocalizations are bound to active sniffing behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 399. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00399>
- Slater, R., Cantarella, A., Gallella, S., Worley, A., Boyd, S., Meek, J., & Fitzgerald, M. (2006). Cortical pain responses in human infants. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(14), 3662-3666. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0348-06.2006>
- Smith, K. E., & Pollak, S. D. (2020). Early life stress and development : Potential mechanisms for adverse outcomes. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s11689-020-09337-y>
- Smith, M. L., Asada, N., & Malenka, R. C. (2021). Anterior cingulate inputs to nucleus accumbens control the social transfer of pain and analgesia. *Science*, 371(6525), 153-159. <https://doi.org/10.1126/science.abe3040>
- Smith, M. L., Hostetler, C. M., Heinricher, M. M., & Ryabinin, A. E. (2016). Social transfer of pain in mice. *Science Advances*, 2(10), e1600855. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600855>
- Spittle, A. J., Treyvaud, K., Doyle, L. W., Roberts, G., Lee, K. J., Inder, T. E., Cheong, J. L. Y., Hunt, R. W., Newnham, C. A., & Anderson, P. J. (2009). Early emergence of behavior and social-emotional problems in very preterm infants. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 48(9), 909-918. <https://doi.org/10.1097/CHI.0b013e3181af8235>
- Stelzner, D. J. (1971). The normal postnatal development of synaptic end-feet in the lumbosacral spinal cord and of responses in the hind limbs of the albino rat. *Exp Neurol*, 31(3), 337-357. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(71\)90237-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(71)90237-8)
- Stickley, A., Koyanagi, A., Kawakami, N., & Group, W. W. M. H. J. S. (2015). Childhood adversities and adult-onset chronic pain : Results from the World Mental Health

- Survey, Japan. *European Journal of Pain*, 19(10), 1418-1427.  
<https://doi.org/10.1002/ejp.672>
- Stil, A., Liabeuf, S., Jean-Xavier, C., Brocard, C., Viemari, J.-C., & Vinay, L. (2009). Developmental up-regulation of the potassium-chloride cotransporter type 2 in the rat lumbar spinal cord. *Neuroscience*, 164(2), 809-821.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.08.035>
- Sue Carter, C., Courtney Devries, A., & Getz, L. L. (1995). Physiological substrates of mammalian monogamy : The prairie vole model. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 19(2), 303-314. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)00070-H](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)00070-H)
- Swerdlow, N. R., Kuczenski, R., Goins, J. C., Crain, S. K., Ma, L. T., Bongiovanni, M. J., & Shoemaker, J. M. (2005). Neurochemical analysis of rat strain differences in the startle gating-disruptive effects of dopamine agonists. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 80(2), 203-211. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.11.002>
- Takahashi, L. K., Thomas, D. A., & Barfield, R. J. (1983). Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by residents during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 97(3), 207-212.
- Takatsuru, Y., Yoshitomo, M., Nemoto, T., Eto, K., & Nabekura, J. (2009). Maternal separation decreases the stability of mushroom spines in adult mice somatosensory cortex. *Brain Research*, 1294, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.07.092>
- Tau, G. Z., & Peterson, B. S. (2010). Normal development of brain circuits. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 147-168. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.115>
- Taylor, B. K., & Westlund, K. N. (2017). The noradrenergic locus caeruleus as a chronic pain generator. *Journal of Neuroscience Research*, 95(6), 1336-1346.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.23956>
- Teissier, A., Le Magueresse, C., Olusakin, J., Andrade da Costa, B. L. S., De Stasi, A. M., Bacci, A., Imamura Kawasawa, Y., Vaidya, V. A., & Gaspar, P. (2020). Early-life stress impairs postnatal oligodendrogenesis and adult emotional behaviour through activity-dependent mechanisms. *Mol Psychiatry*, 25(6), 1159-1174.  
<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0493-2>
- Terminology | International Association for the Study of Pain. (s. d.). *International Association for the Study of Pain (IASP)*. Consulté 24 octobre 2024, à l'adresse <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>
- Thomas, D. A., Takahashi, L. K., & Barfield, R. J. (1983). Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 97(3), 201-206.
- Tietjen, G. E., Buse, D. C., & Collins, S. A. (2016). Childhood Maltreatment in the Migraine Patient. *Current Treatment Options in Neurology*, 18(7), 31.  
<https://doi.org/10.1007/s11940-016-0415-4>

- Tietjen, G. E., Buse, D. C., Fanning, K. M., Serrano, D., Reed, M. L., & Lipton, R. B. (2015). Recalled maltreatment, migraine, and tension-type headache : Results of the AMPP Study. *Neurology*, 84(2), 132-140. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001120>
- Timmers, I., Park, A. L., Fischer, M. D., Kronman, C. A., Heathcote, L. C., Hernandez, J. M., & Simons, L. E. (2018). Is Empathy for Pain Unique in Its Neural Correlates? A Meta-Analysis of Neuroimaging Studies of Empathy. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 12, 289. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00289>
- Tousignant, B., Eugène, F., & Jackson, P. L. (2017). A developmental perspective on the neural bases of human empathy. *Infant Behavior & Development*, 48(Pt A), 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.infbeh.2015.11.006>
- Treede, R.-D., Rief, W., Barke, A., Aziz, Q., Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Evers, S., Finnerup, N. B., First, M. B., Giamberardino, M. A., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Perrot, S., Scholz, J., Schug, S., ... Wang, S.-J. (2019). Chronic pain as a symptom or a disease : The IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). *Pain*, 160(1), 19-27. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001384>
- Tuttle, A. H., Philip, V. M., Chesler, E. J., & Mogil, J. S. (2018). Comparing phenotypic variation between inbred and outbred mice. *Nature Methods*, 15(12), 994-996. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0224-7>
- Uhelski, M. L., & Fuchs, P. N. (2010). Maternal separation stress leads to enhanced emotional responses to noxious stimuli in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 212(2), 208-212. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.03.055>
- Vallee, M., Mayo, W., Maccari, S., Le Moal, M., & Simon, H. (1996). Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters : Relationship to corticosterone secretion response. *Brain Res*, 712(2), 287-292. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01459-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01459-4)
- van Hecke, O., Torrance, N., & Smith, B. H. (2013). Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. *BJA: British Journal of Anaesthesia*, 111(1), 13-18. <https://doi.org/10.1093/bja/aet123>
- van Praag, H., & Frenk, H. (1991). The development of stimulation-produced analgesia (SPA) in the rat. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 64(1-2), 71-76. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(91\)90210-a](https://doi.org/10.1016/0165-3806(91)90210-a)
- Vendruscolo, L. F., Pamplona, F. A., & Takahashi, R. N. (2004). Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. *Brain Research*, 1030(2), 277-283. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.10.016>
- Vilela, F. C., Vieira, J. S., Giusti-Paiva, A., & Silva, M. L. da. (2017). Experiencing early life maternal separation increases pain sensitivity in adult offspring. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 62, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.07.003>

- Vilela, F. C., Vieira, J. S., Vitor-Vieira, F., Kalil-Cutti, B., da Silva, J. R. T., Giusti-Paiva, A., & da Silva, M. L. (2021). Maternal separation increases pain sensitivity by reducing the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus and noradrenergic neurons in locus coeruleus. *Neurosci Lett*, 748, 135734. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.135734>
- Walker, C.-D., Xu, Z., Rochford, J., & Johnston, C. C. (2008). Naturally occurring variations in maternal care modulate the effects of repeated neonatal pain on behavioral sensitivity to thermal pain in the adult offspring. *Pain*, 140(1), 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.08.004>
- Walker, F. R., Naicker, S., Hinwood, M., Dunn, N., & Day, T. A. (2009). Strain differences in coping behaviour, novelty seeking behaviour, and susceptibility to socially conditioned fear : A comparison between Wistar and Sprague Dawley rats. *Stress*, 12(6), 507-516. <https://doi.org/10.3109/10253890802673134>
- Wang, L., Jiao, J., & Dulawa, S. C. (2011). Infant maternal separation impairs adult cognitive performance in BALB/cJ mice. *Psychopharmacology*, 216(2), 207-218. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2209-4>
- Watson, R. E., DeSesso, J. M., Hurt, M. E., & Cappon, G. D. (2006). Postnatal growth and morphological development of the brain : A species comparison. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 77(5), 471-484. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20090>
- Weaver, S. A., Diorio, J., & Meaney, M. J. (2007). Maternal separation leads to persistent reductions in pain sensitivity in female rats. *The Journal of Pain*, 8(12), 962-969. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2007.07.001>
- Weber, M., Paxinos, G., & Richardson, R. (2000). Conditioned changes in ultrasonic vocalizations to an aversive olfactory stimulus are lateralized in 6-day-old rats. *Developmental Psychobiology*, 37(3), 121-128. [https://doi.org/10.1002/1098-2302\(200011\)37:3<121::aid-dev1>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/1098-2302(200011)37:3<121::aid-dev1>3.0.co;2-f)
- Wei, L., David, A., Duman, R. S., Anisman, H., & Kaffman, A. (2010). Early life stress increases anxiety-like behavior in Balb c mice despite a compensatory increase in levels of postnatal maternal care. *Hormones and Behavior*, 57(4-5), 396-404. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.007>
- White, M. C., & Wolf, A. R. (2004). Pain and stress in the human fetus. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18(2), 205-220. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2003.12.011>
- White, N. R., Adox, R., Reddy, A., & Barfield, R. J. (1992). Regulation of rat maternal behavior by broadband pup vocalizations. *Behavioral and Neural Biology*, 58(2), 131-137. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(92\)90363-9](https://doi.org/10.1016/0163-1047(92)90363-9)
- White, N. R., Cagiano, R., Moises, A. U., & Barfield, R. J. (1990). Changes in mating vocalizations over the ejaculatory series in rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of*

*Comparative Psychology*, 104(3), 255-262. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.104.3.255>

- Williams, A. M., Reis, D. J., Powell, A. S., Neira, L. J., Nealey, K. A., Ziegler, C. E., Kloss, N. D., Bilimoria, J. L., Smith, C. E., & Walker, B. M. (2012). The effect of intermittent alcohol vapor or pulsatile heroin on somatic and negative affective indices during spontaneous withdrawal in Wistar rats. *Psychopharmacology*, 223(1), 75-88. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2691-3>
- Williams, M. D., & Lascelles, B. D. X. (2020). Early Neonatal Pain-A Review of Clinical and Experimental Implications on Painful Conditions Later in Life. *Frontiers in Pediatrics*, 8, 30. <https://doi.org/10.3389/fped.2020.00030>
- Winslow, J. T., & Insel, T. R. (1991). Serotonergic modulation of the rat pup ultrasonic isolation call : Studies with 5HT1 and 5HT2 subtype-selective agonists and antagonists. *Psychopharmacology*, 105(4), 513-520. <https://doi.org/10.1007/BF02244372>
- Witt, A., Theurel, A., Tolsa, C. B., Lejeune, F., Fernandes, L., de Jonge, L. van H., Monnier, M., Bickle Graz, M., Barisnikov, K., Gentaz, E., & Hüppi, P. S. (2014). Emotional and effortful control abilities in 42-month-old very preterm and full-term children. *Early Human Development*, 90(10), 565-569. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2014.07.008>
- Wöhr, M., Borta, A., & Schwarting, R. K. W. (2005). Overt behavior and ultrasonic vocalization in a fear conditioning paradigm : A dose-response study in the rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 84(3), 228-240. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.004>
- Yalcin, I., Bartha, F., & Barrot, M. (2014). Emotional consequences of neuropathic pain : Insight from preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*, 47, 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.08.002>
- Yalcin, I., Bohren, Y., Waltisperger, E., Sage-Ciocca, D., Yin, J. C., Freund-Mercier, M.-J., & Barrot, M. (2011). A Time-Dependent History of Mood Disorders in a Murine Model of Neuropathic Pain. *Biological Psychiatry*, 70(10), 946-953. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.07.017>
- Yalcin, I., Coubard, S., Bodard, S., Chalon, S., & Belzung, C. (2008). Effects of 5,7-dihydroxytryptamine lesion of the dorsal raphe nucleus on the antidepressant-like action of tramadol in the unpredictable chronic mild stress in mice. *Psychopharmacology*, 200(4), 497-507. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1227-3>
- Yamada, K., Matsudaira, K., Tanaka, E., Oka, H., Katsuhira, J., & Iso, H. (2017). Sex-specific impact of early-life adversity on chronic pain : A large population-based study in Japan. *Journal of Pain Research*, 10, 427-433. <https://doi.org/10.2147/JPR.S125556>

- Yamagishi, A., Lee, J., & Sato, N. (2020). Oxytocin in the anterior cingulate cortex is involved in helping behaviour. *Behav Brain Res*, 393, 112790.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112790>
- Yamagishi, A., Okada, M., Masuda, M., & Sato, N. (2020). Oxytocin administration modulates rats' helping behavior depending on social context. *Neurosci Res*, 153, 56-61.  
<https://doi.org/10.1016/j.neures.2019.04.001>
- Yang, Y., Cheng, Z., Tang, H., Jiao, H., Sun, X., Cui, Q., Luo, F., Pan, H., Ma, C., & Li, B. (2017). Neonatal Maternal Separation Impairs Prefrontal Cortical Myelination and Cognitive Functions in Rats Through Activation of Wnt Signaling. *Cereb Cortex*, 27(5), 2871-2884. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhw121>
- Yasuda, M., Shinoda, M., Honda, K., Fujita, M., Kawata, A., Nagashima, H., Watanabe, M., Shoji, N., Takahashi, O., Kimoto, S., & Iwata, K. (2016). Maternal Separation Induces Orofacial Mechanical Allodynia in Adulthood. *Journal of Dental Research*, 95(10), 1191-1197. <https://doi.org/10.1177/0022034516661159>
- Yi, L., Zhang, H., Sun, H., Zhou, L., Chen, Y., Xuan, L., Jiang, Y., & Xu, S. (2017). Maternal Separation Induced Visceral Hypersensitivity from Childhood to Adulthood. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, 23(2), 306-315.  
<https://doi.org/10.5056/jnm16089>
- Yoon, C., Wook, Y. Y., Sik, N. H., Ho, K. S., & Mo, C. J. (1994). Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 59(3), 369-376.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0304-3959(94)90023-X)
- Yoon, Y. W., Lee, D. H., Lee, B. H., Chung, K., & Chung, J. M. (1999). Different strains and substrains of rats show different levels of neuropathic pain behaviors. *Experimental Brain Research*, 129(2), 167-171. <https://doi.org/10.1007/s002210050886>
- You, D. S., Albu, S., Lisenbhardt, H., & Meagher, M. W. (2019). Cumulative Childhood Adversity as a Risk Factor for Common Chronic Pain Conditions in Young Adults. *Pain Medicine*, 20(3), 486-494. <https://doi.org/10.1093/pmt/pny106>
- Zeiss, C. J. (2021). Comparative Milestones in Rodent and Human Postnatal Central Nervous System Development. *Toxicologic Pathology*, 49(8), 1368-1373.  
<https://doi.org/10.1177/01926233211046933>
- Zoratto, F., Sbriccoli, M., Martinelli, A., Glennon, J. C., Macrì, S., & Laviola, G. (2018). Intranasal oxytocin administration promotes emotional contagion and reduces aggression in a mouse model of callousness. *Neuropharmacology*, 143, 250-267.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.010>